



**Daniela Patrícia  
Duarte Figueiredo  
Framegas**

**Impacto da contaminação de alimentos prontos a  
comer na Saúde Pública**



**Daniela Patrícia  
Duarte Figueiredo  
Framegas**

**Impacto da contaminação de alimentos prontos a  
comer na Saúde Pública**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Gil, Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Daniela Leite, Diretora Técnica do laboratório YourLab Segurança Alimentar na empresa VLM Consultores, S.A..

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**  
professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Jorge Alexandre Saraiva**  
investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Ana Maria Pissarra Gil**  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

**Doutora Daniela Costa Leite**  
diretora técnica do laboratório YourLab Segurança Alimentar na empresa VLM Consultores, S.A.

## **agradecimentos**

Quero agradecer aos meus pais por todo o apoio prestado durante o meu percurso universitário.

Agradeço à minha irmã pela confiança que sempre me transmitiu e que de certa forma me ajudou a seguir em frente nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu namorado, Ricardo, porque sem ele nunca teria conseguido terminar este trabalho. Esteve sempre presente em todos os momentos, sempre prestável e paciente.

Agradeço à Daniela Leite por toda a ajuda dada na elaboração da dissertação e pela forma como me acolheu durante o estágio.

## palavras-chave

Saúde pública, *Hazard Analysis and Critical Control Points*, qualidade microbiológica, Toxinfecções Alimentares Coletivas, Doenças de Declaração Obrigatória.

## resumo

Os estilos de vida das pessoas afetam vários aspetos das suas rotinas, nomeadamente os hábitos alimentares. Com a mudança dos estilos de vida que se tem verificado ao longo dos últimos anos, as pessoas têm aumentado consideravelmente a tendência para consumir refeições fora de casa, nomeadamente em restaurantes e cantinas. A segurança alimentar nestes locais é assegurada pela aplicação de boas práticas de higiene e de fabrico bem como a implementação do sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP). Segundo a bibliografia, tem-se verificado que os principais locais suspeitos de origem de doenças por alimentos são em estabelecimentos de restauração, sendo este caso uma questão de preocupação para a Saúde Pública. Os objetivos para este trabalho são a descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular, que decorreu na empresa VLM, Consultores S.A., mais propriamente no laboratório YourLab Segurança Alimentar, bem como a integração do caso de estudo nas atividades desenvolvidas. O caso de estudo diz respeito à avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir analisados no laboratório YourLab Segurança Alimentar nos anos de 2008 até 2009 e estabelecer uma relação com dados de toxinfecções alimentares coletivas na região centro do país, que é a zona onde foram feitas as recolhas dos alimentos analisados. Concluiu-se que os dados analíticos relativos aos alimentos analisados no laboratório apresentam boa qualidade microbiológica. Não foram possíveis apurar os dados relativos a notificações de Toxinfecções Alimentares Coletivas (TAC), foi apenas possível analisar algumas Doenças de Declaração Obrigatória (DDO), nomeadamente a “Brucelose”, as “Febres tifóide e paratifoide” e “Outras salmoneloses”.

**keywords**

Public Health, *Hazard Analysis and Critical Control Points*, microbiological quality, Collective Food Poisoning, Obligatory Disease Declaration.

**abstract**

The people lifestyles affect various aspects of their routines, including eating habits. With the changing of lifestyles that have occurred over the past few years, people have increased considerably the tendency to consume meals outside the home, particularly in restaurants and canteens. Food safety in these places is ensured by the application of good hygiene and manufacturing practices as well as the implementation of the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system. According to the literature, it is suspected that the main source of food borne diseases are catering establishments, being a matter of concern for Public Health. The objectives for this work are the description of the curricular internship activities, which took place in the company VLM Consultores SA, more specifically on the YourLab Food Safety laboratory, as well as the integration of the case of study activities. The case study concerns the assessment of the microbiological quality of ready-to-eat food in the laboratory YourLab Food Security between the years of 2008 to 2009 and establish a relationship with the data of Collective Food Poisoning in the central region (which is the area where it was made collections of the analyzed food). It was concluded that the data of the analysis of analyzed food on the laboratory have good microbiological quality. It was not possible get the data of notifications of Collective Food Poisoning, was only possible to analyze some of Obligatory Disease Declaration, namely "Brucellosis", the "Typhoid and Paratyphoid Fevers 'and' Other salmonella".

## Índice

Índice .....	1
Abreviaturas, siglas e simbologia .....	3
CAPÍTULO I. Objetivos de estágio e organização da dissertação .....	5
CAPÍTULO II. Revisão Bibliográfica .....	7
II.1 Fatores que contribuem para a transmissão de doenças por alimentos .....	7
II.2 Incidência e notificação das toxinfecções alimentares na Europa e em Portugal .....	9
II.3 Principais doenças transmitidas por alimentos .....	12
II.3.1 Microrganismos Patogénicos .....	12
II. 4 Ferramentas de gestão da segurança alimentar .....	16
II.4.1 Legislação nacional relativa à higiene dos géneros alimentícios .....	16
II.4.2 Programa de Pré-requisitos .....	17
II.4.3 Resumo do Sistema de Análise de Perigos e Pontos de controlo críticos (HACCP) ..	19
II.4.4 Identificação de Perigos Alimentares.....	20
II.4.5 Importância das análises microbiológicas no controlo de sistemas HACCP .....	26
CAPÍTULO III. Atividades desempenhadas no estágio .....	29
III.1 Acompanhamento da acreditação do laboratório – NP EN ISO/IEC 17025 .....	29
III.1.1 Requisitos de Gestão .....	30
III.1.2 Requisitos Técnicos .....	31
III.2 Serviços efetuados no laboratório.....	35
III.2.1 Amostragem e receção das amostras .....	35
III.2.2 Preparação das amostras .....	40
III.2.3 Análises microbiológicas efetuadas no laboratório YourLab Segurança Alimentar	40
III.2.4 Métodos de cálculo e expressão dos resultados .....	45
III.2.3 Registo dos resultados .....	46
III.3 Caso de estudo – Impacto da contaminação de alimentos prontos a comer na Saúde Pública .....	46
III.3.1 Introdução – O problema em estudo .....	46
III.3.2 Descrição dos estabelecimentos de onde provêm os alimentos para análise .....	47
III.3.4 Análises microbiológicas efetuadas consideradas para o estudo.....	48
III.3.6 Interpretação dos dados relativos às análises microbiológicas efetuadas no Laboratório YourLab Segurança Alimentar desde 2009 a 2011 .....	49
III.3.7 Resultados e Discussão.....	52
III.4 Comparação da avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos com dados de toxinfecções alimentares .....	57
III.5 Avaliação dos casos de DDO de origem alimentar na Região Centro referente aos anos de 2009 até 30 de Maio de 2012.....	59
III.5 Conclusão.....	65
Bibliografia .....	66

Portais da Internet: .....	67
ANEXOS .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 1 - Tabela das instruções de trabalho, metodologias e procedimentos e os respectivos documentos de referência. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 2 - Método horizontal para contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 3 - Regras gerais para contagem de Bolores e Leveduras a 25 °C Parte 1: Método corrente. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 4 - Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes.	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 5 - Regras gerais para a pesquisa de <i>Escherichia coli</i> . ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 6 - Regras gerais para a contagem de <i>Escherichia coli</i> $\beta$ -glucuronidase positiva. Técnica de contagem de colónias a 44°C usando 5-bromo-4-cloro-3-indol $\beta$ -D-glucuronide. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 7 - Zaragatoas - Contagem de colónias a 30°C.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 8 - Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 9 - Método horizontal para a deteção de <i>Salmonella</i> spp.	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 10 - Deteção e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> pelo método horizontal. Parte 1: Método de deteção. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 11 - Deteção e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> pelo método horizontal. Parte 2: Método de contagem. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 12 – Método horizontal para a contagem de presumíveis <i>Bacillus cereus</i> - técnica de contagem de colónias a 30°C.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 13 - Contagem de microrganismos cultiváveis. Contagem por inoculação em nutriente agar. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Anexo 14 – Deteção e contagem de <i>Escherichia coli</i> e bactérias coliformes. Parte 1: Método de filtração por membrana. ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>



## Abreviaturas, siglas e simbologia

BPW – *Buffered Peptone Water*  
BPF – Boas Práticas de Fabrico  
BPH – Boas Práticas de Higiene  
CCPs – *Critical Control Points*  
CE – Comissão Europeia  
DDO – Doenças de Declaração Obrigatória  
DPA – Ácido dipicolínico  
EA/ILAC - *European cooperation for Accreditation/International Laboratory Accreditation Cooperation*  
EFSA – *European Food Safety Authority*  
EM – Estados Membros  
FDA – *Food and Drugs Administration*  
GDH – Grupos de Diagnóstico Homogéneos  
HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*  
IT – Instruções de Trabalho  
IAEA - *International Atomic Energy Agency*  
IPAC – Instituto Português de Acreditação  
IPSS – Instituições Particulares de Solidariedade Social  
IRMM - *Institute for Reference Materials and Measurements*  
ICMSF – *International Commission on Microbiological Specification for Foods*  
ME – Método de Ensaio  
MQ – Manual de Qualidade  
MRC – Material de Referência Certificado  
NASA - *National Aeronautics and Space Administration*  
NIST - *National Institute for Standards and Technology*  
RQ – Responsável da Qualidade  
RT – Responsável Técnico  
SARA – Sistema de Alerta e Resposta Apropriada  
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência adquirida  
TA – Toxinfecção Alimentar  
TAC – Toxinfecção Alimentar Colectiva  
TBX - *Tryptone Bile X-glucuronide*  
UE – União Europeia  
UFC – Unidades Formadoras de Colónias  
VMA – Valor Máximo Acaitável  
WHO – *World Health Administration*  
 $a_w$  – Atividade da água  
g - Gramas  
mL – Mililitro  
°C – Graus Celsius  
 $\mu\text{m}$  – Micrómetro



# I

## **CAPÍTULO I. Objetivos de estágio e organização da dissertação**

No âmbito do mestrado em Biotecnologia Industrial e Ambiental foi-me atribuído um estágio curricular na empresa VLM Consultores.

O objetivo principal do estágio curricular é a aquisição de experiência de trabalho em ambiente empresarial, e como consequência o conhecimento da estrutura organizacional bem como a missão, os valores e os objetivos da empresa. A VLM Consultores, S.A. é uma empresa acreditada de consultadoria, que possui uma estrutura organizacional vasta, envolvendo principalmente serviços de formação e ajuda no crescimento e sucesso de outras empresas, em diversas áreas de trabalho. As atividades desempenhadas neste estágio desenrolaram-se no laboratório de análises microbiológicas Yourlab Segurança alimentar. Os objetivos específicos propostos para este estágio são a aquisição de conhecimentos relativamente aos seguintes itens:

- Realidade de um dia-a-dia num laboratório de análises microbiológicas a alimentos e águas entrando em contato com as metodologias de análise dos ensaios realizados;
- Realidade empresarial em empresas do ramo alimentar;
- Procedimentos de controlo de qualidade de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”;
- Legislação vigente aplicável ao ramo de segurança alimentar e análises microbiológicas;
- Desenvolvimento do caso de estudo: Impacto da contaminação dos alimentos prontos a comer na saúde pública.

As principais funções desempenhadas para se atingirem os objetivos propostos foram a preparação de amostras e meios de cultura, realização de recolhas e de análises microbiológicas a alimentos e águas, controlo de higienização, controlo de stocks de materiais e consumíveis, participação na implementação da Norma NP EN ISO/IEC

17025 17025 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração” e acompanhamento de ensaios interlaboratoriais.

Para além das atividades desempenhadas no estágio, é também apresentado um caso de estudo em que o objeto de estudo está relacionado com o título da dissertação, “Impacto da contaminação de alimentos prontos a comer na Saúde Pública”. Relativamente ao caso de estudo, é proposto:

- Avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos analisados no laboratório YourLab Segurança Alimentar;
- Comparação dos dados de toxinfecções provocadas por alimentos e a qualidade microbiológica dos alimentos analisados no laboratório, no mesmo intervalo de tempo.

Este trabalho está organizado em três capítulos. O primeiro diz respeito à introdução deste trabalho que inclui os objetivos propostos para o estágio e uma breve descrição da organização deste trabalho escrito. O segundo capítulo inclui a revisão bibliográfica necessária principalmente para a contextualização em assuntos relativos ao tema da dissertação da tese, que vão desde os fatores que influenciam as doenças de origem alimentar até às ferramentas de gestão de segurança alimentar. O terceiro capítulo, que é o mais extenso deste trabalho, descrevem-se as principais atividades realizadas no estágio bem como alguma da informação que teve de ser adquirida para uma melhor compreensão da NP EN ISO/IEC 17025 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração” e as atividades realizadas no laboratório de microbiologia alimentar. Segue-se a apresentação do trabalho para a dissertação da tese designado como caso de estudo, em que é feita uma integração do trabalho nas atividades desempenhadas no estágio. De seguida são apresentados os resultados e discussão dos mesmos.

# II

## **CAPÍTULO II. Revisão Bibliográfica**

### **II.1 Fatores que contribuem para a transmissão de doenças por alimentos**

Hoje em dia, a preocupação com a qualidade e a segurança dos alimentos é muito maior do que à alguns anos atrás. Antes, como havia menor acesso à informação, não havia uma preocupação tão grande com este assunto. Quando acontecia um surto num determinado país, a notícia não se disseminava, ao passo que hoje em dia, com todos os meios de comunicação social disponíveis, em poucos segundos a informação está acessível para todo o mundo. Também houve uma grande evolução tanto no tratamento das infeções transmitidas por alimentos com a administração de antibióticos como no desenvolvimento de métodos melhores e mais rápidos para a deteção do agente inficioso. Apesar da evolução dos meios de comunicação, e por isso existe mais acesso à informação, alguns médicos acreditam que as doenças transmitidas por alimentos têm aumentado nos últimos 20 anos (1).

Os principais fatores que contribuem para este facto são as mudanças demográficas, nos estilos de vida dos consumidores, na produção de alimentos e na economia e por fim a evolução dos microrganismos. As mudanças demográficas que têm maior impacto são o aumento da população envelhecida, devido à maior esperança média de vida, e o aumento do número de pessoas com o sistema imunitário debilitado (1).

A suscetibilidade aos agentes patogénicos contraídos por alimentos varia consoante a população, ou seja, duas pessoas podem comer um alimento contaminado na mesma quantidade e só uma delas ficar doente. Isto porque existem grupos de risco na população sendo estes crianças e bebés, idosos, mulheres grávidas, pessoas que tomam determinadas medicações e pessoas com algumas doenças, tais como a SIDA, o cancro e as diabetes que enfraquecem o sistema imunitário. O grande problema é que os grupos de risco estão a aumentar nos países industrializados ocupando uma fatia cada vez maior da população (1).

Para além destes grupos de risco, a incidência de doenças desenvolvidas por ingestão de alimentos contaminados pode variar com a idade dos indivíduos, pela quantidade de contaminação consumida e o estado de saúde do indivíduo.

A mudança mais significativa no estilo de vida das pessoas, que contribui para uma maior suscetibilidade às doenças transmitidas por alimentos, é o maior consumo de alimentos e refeições fora de casa (1). As pessoas não têm tempo para preparar as suas refeições diárias em casa e, conseqüentemente, recorrem cada vez mais a restaurantes e cantinas, ou levam lanches ou refeições de casa. Quando se tem uma refeição quer num restaurante ou em qualquer estabelecimento que sirva comida, os alimentos já foram transportados, cozinhados, arrefecidos, armazenados, transportados de novo, reaquecidos e manuseados por inúmeras pessoas. Cada um dos processos acarreta um perigo que pode permitir a sobrevivência e crescimento de bactérias que podem levar a infeções ou intoxicações. Com a evolução da industrialização, há uma maior variedade de oferta no ramo da restauração para todos os gostos e para todas as condições socioeconómicas (1). Como tal, é necessário haver um controlo desses alimentos para o bem da saúde pública. Há cuidados que se têm de ter desde a receção dos alimentos no local onde vão ser armazenados até serem confeccionados, e também, a quando do seu acondicionamento até à hora de serem consumidos. Apesar da confeção dos alimentos geralmente eliminar alguns dos microrganismos que possam estar presentes, se a confeção não for bem realizada e se não se tiverem cuidados na manipulação dos alimentos pode haver contaminação dos mesmos. Por isso, quando se consome uma refeição num estabelecimento está-se a confiar o estado do alimento e o manuseamento do mesmo às pessoas que aí trabalham.

O hábito de consumir refeições fora de casa também leva a que as pessoas diminuam o costume de cozinhar em casa e o percam o hábito das boas práticas de segurança alimentar na confeção e manuseamento dos alimentos. É também diminuída a informação passada aos jovens, apesar de estes atualmente terem muita informação disponível (1). Por outro lado, quando se levam refeições preparadas em casa, se não for bem acondicionada, corre-se o risco de se criarem condições favoráveis ao crescimento de bactérias ou outros microrganismos.

Relativamente à produção e industrialização dos alimentos, também têm havido grandes modificações ao longo das décadas. No passado, quando havia algum surto era relativamente fácil de identificar qual era o alimento causador (1). A distribuição dos alimentos era praticamente local, logo era fácil identificar de onde provinham os alimentos contaminados que causavam doença às pessoas. Hoje em dia é tudo muito diferente, a importação de alimentos é muito elevada e quando há transmissão de

doenças por alimentos é difícil identificar qual a origem, ou pelo menos não é tão fácil como era antigamente. Hoje em dia, por exemplo, os animais para carne são criados em manadas com muitos animais, e estão sempre muito juntos e se forem por qualquer motivo infetados por algum microrganismo podem passar facilmente aos outros animais (1).

Outro problema relacionado com os animais é o facto de eles poderem ser portadores de microrganismos que são ofensivos para o homem mas que para o animal, não é verificado nenhum indício de doença o que torna mais difícil de resolver este problema. Para além disto, não é bem conhecido como os animais são contaminados e como transmitem uns aos outros. Por fim, tem de se ter em conta a evolução dos microrganismos. Há cerca de vinte anos atrás, os cientistas não conheciam três dos quatro patógenos que o *Centers for Disease Control and Prevention* considera hoje em dia dos mais graves nas doenças transmitidas por alimentos – *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Como seres vivos, os patógenos estão em constante evolução (1). Apresentam novas habilidades para causar surtos. Alguns cientistas descobriram que algumas bactérias já conseguem crescer em ambientes em que anteriormente não conseguiam sobreviver e como tal há alimentos que antes eram considerados como seguros, e agora são classificados como alimentos de risco. Por exemplo, a *E. coli* O157:H7, foi inicialmente chamada de doença dos hambúrgueres porque aparecia na carne mal cozinhada e posteriormente já se verificou que também está presente em salame, cidra de maçã, leite e alface (1). Esta bactéria consegue sobreviver em pH mais baixo do que se pensava anteriormente o que pode levar a surtos em alimentos acidificados. Outros exemplos são a *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*, que se sabe hoje em dia que podem sobreviver e crescer a temperaturas de refrigeração (1).

## **II.2 Incidência e notificação das toxinfecções alimentares na Europa e em Portugal**

A Diretiva 2003/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Novembro de 2003 relativa à “vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos,” estabeleceu a obrigatoriedade de recolha, análise e publicação dos surtos de origem alimentar em todos os Estados-Membros com o objetivo de assegurar a obtenção das informações necessárias para a avaliação das tendências e origens pertinentes das doenças de origem alimentar na EU.

Para se poder avaliar a incidência de toxinfecções alimentares (TA) e os riscos que os organismos patogénicos representam, tem de haver o registo das mesmas por parte das entidades competentes, como é o caso das autoridades de saúde. No entanto, estes também estão dependentes da participação dos consumidores e das ações desenvolvidas pelas entidades nacionais com responsabilidade sanitária (2). Apesar das notificações e dos esforços que têm sido feitos para aumentar o número destas, é preciso ter em conta que os casos reais são muito maiores do que aqueles que são notificados, não só por este “programa” estar mais evoluído em alguns países do que outros, mas também porque uma grande parte dos casos de TA não chegam sequer aos hospitais, onde se dá o início do processo de notificação e os casos que chegam aos hospitais muitas vezes não são notificados (3).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (“*World Health Organization*” - WHO) as estimativas indicam que as doenças de origem alimentar são 300 a 350 vezes mais frequentes do que indicam os casos declarados (3). Estes dados, são na sua maioria estimativas uma vez que a maior parte dos países não dispõem de sistemas de registo de dados relativos às notificações de doenças de origem alimentar, não se verificando apenas este facto nos países em desenvolvimento, mas também, alguns países desenvolvidos como por exemplo alguns países dos Estados Membros (EM) da União Europeia (UE) (3). Os países que já possuem este sistema a funcionar há algumas décadas, têm resultado de uma forma muito eficaz (3). Embora seja perceptível que algumas das principais causas de TA sejam as más práticas de manuseamento, preparação, acondicionamento e distribuição dos alimentos ao longo da cadeia alimentar, é necessária a existência de dados das TA para que sejam feitos estudos para uma correta avaliação (3).

Os dados públicos mais recentes disponíveis a nível Europeu são relativos ao ano 2010 através do relatório da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA - “*European Food Safety Authority*”) como pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1- Número de surtos, casos, hospitalizações e mortes registadas em 2009 e 2010 na União Europeia segundo os relatórios anuais da EFSA.**

Ano	Nº de surtos	Nº de casos	Nº de hospitalizações	Nº de mortes
2009	5550	48964	4356	46
2010	5262	43373	4695	25



Em 2010 foram reportados 5262 surtos de origem alimentar na União Europeia originando 43373 casos, 4695 hospitalizações e 25 mortes (4). Verifica-se uma ligeira redução relativamente ao número de surtos (5550) e casos (48964) do ano anterior e uma redução mais acentuada no número de mortes uma vez que em 2009 morreram 46 pessoas (5), (4). No entanto o número de hospitalizações sofreu um pequeno aumento dado que em 2009 foram reportadas 4356 (5), (4). Relativamente às principais causas de surtos tem-se em primeiro lugar a *Salmonella*, seguida de vírus, *Campylobacter* e toxinas bacterianas (4). Em 2009 a *Campylobacter* não se encontrava entre as principais causas de surtos o que indica o aumento deste microrganismo nos alimentos e como tal devem ser tomadas medidas preventivas e de controlo para este microrganismo (5). Como principais fontes alimentares de surtos estão os ovos e produtos derivados, refeições mistas e *buffet*, vegetais e produtos derivados (4).

Portugal não possui ainda um sistema nacional único de vigilância e controlo de doenças de origem alimentar, existem várias entidades, tais como as Doenças de Declaração Obrigatória da Direção Geral de Saúde (DGS), o Sistema de Alerta e Resposta Apropriada da Direção Geral da Saúde (SARA), os alertas por Toxinfecções Alimentares Coletivas (TAC) por força da circular normativa N.º14/DT de 9/10/2001 da DGS e os Grupos de Diagnósticos Homogéneos (GDH) dos hospitais, tornando a informação dispersa e consequentemente de difícil consulta. A forma de obter a informação a nível nacional reunida é através dos relatórios anuais da EFSA em que é apresentada a informação anual enviada pelos países da União Europeia. Em 2001 a Direção Geral de Saúde realizou uma circular normativa para informar todos os oficiais de saúde acerca da vigilância e controlo das TAC, uma vez que até então apenas eram declarados os casos que se inseriam nas DDO (6). Esta circular tem como objetivo agilizar e normalizar os procedimentos que conduzam à rápida comunicação de uma TAC e fornecer as orientações referentes à resposta a ser dada pelos serviços de saúde, nomeadamente no que respeita à investigação epidemiológica (6). No entanto, a informação relativamente a TAC não é publicada em nenhum documento oficial em Portugal apenas é publicada a informação quanto às DDO em relatórios, sendo que apesar de se saber quais as doenças prováveis de serem disseminadas por exposição a alimentos contaminados não existe uma secção específica para doenças de origem alimentar e como tal a informação disponível é pouco pertinente para os estudos nesta área.

## **II.3 Principais doenças transmitidas por alimentos**

A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO) já publicou dados que demonstram a importância de bactérias, vírus e parasitas como agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos (3). Segundo esta fonte, atualmente as principais causas de morte nos países em desenvolvimento são o consumo de alimentos contaminados e de água imprópria para consumo, sendo contabilizados cerca de 1,8 milhões de mortes todos os anos, principalmente crianças (3). As gastroenterites ocupam o primeiro lugar na lista das doenças com maior prevalência no mundo.

As doenças transmitidas por alimentos são de uma forma geral designadas por toxinfecções alimentares no entanto a classificação mais correta são infecções, intoxicações ou infecções mediadas por toxina. Esta classificação é feita de acordo com a atuação do agente causador no trato gastrointestinal (7).

Designa-se por infecção quando é ingerido um alimento em que a causa da doença é a presença de microrganismos vivos prejudiciais como são os exemplos a *Salmonella*, *Shigela*, *Bacillus cereus*, vírus da hepatite A e *Trichinella spiralis* (7). As intoxicações são causadas por a ingestão de toxinas de microrganismos presentes no alimento, mesmo que o microrganismo que as originou já não esteja presente no alimento (7). As toxinas normalmente não apresentam modificações organoléticas no alimento (7). Alguns exemplos dos microrganismos que produzem estas toxinas são *Clostridium botulinum*, a enterotoxina do *Staphylococcus* e as micotoxinas (7). As infecções mediadas por toxina consistem na produção da toxina pelo microrganismo após a ingestão do alimento, sendo exemplos o *Vibrio cholerae* e o *Clostridium perfringens* (7).

### **II.3.1 Microrganismos Patogénicos**

Apesar dos microrganismos patogénicos serem causadores de doenças existem alguns que são mais perigosos do que outros. Na Tabela 2 podem-se distinguir a severidade dos principais microrganismos.

**Tabela 2 - Categorização da severidade de perigos microbiológicos (adaptado de (8)).**

Efeitos dos perigos	Patogénios
1. Moderado, sem risco de vida, sem sequelas, normalmente de curta duração e autolimitantes	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
2. Sério, incapacitante, mas sem riscos de vida, com sequelas raras e de duração limitada	<i>Salmonella</i> spp. (excluindo <i>typhi</i> ) <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Shigella</i> spp. (excluindo <i>dysenteriae I</i> ) <i>Listeria monocytogenes</i>
3A. Grave, risco de vida para a população em geral, sequelas crónicas, longa duração	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Vibrio cholerae O1</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Escherichia coli enterohemorrhagica</i>
3B. Grave, risco de vida para populações restritas, sequelas crónicas, longa duração	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Escherichia coli enteropatogenica</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Os microrganismos patogénicos podem ser bactérias, vírus, fungos e parasitas. No entanto de entre estes, as bactérias patogénicas são as que apresentam maior prevalência nas doenças de origem alimentar sendo cerca de 90% (8). Na Tabela 3 são apresentadas algumas das bactérias patogénicas mais relevantes, o seu período de incubação, os sintomas que apresentam, qual a duração dos sintomas e os alimentos a a presença destes microrganismos está associada.

**Tabela 3 – Características dos principais microrganismos patogênicos causadores de doenças de origem alimentar (adaptado de (7)).**

Bactérias	Período de Incubação	Doença Causada	Sintomas	Duração dos Sintomas	Alimentos Associados
<i>Salmonella typhi</i>  <i>Salmonella paratyphi</i>	6 a 48 h	Bacteremia (presença de bactérias na corrente sanguínea), febre tifoide  Bacteremia, febre entérica	Febre, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, dor de cabeça	1 a 2 dias	Carne crua, frango e peru, leite e derivados, pescado, camarão, molhos e temperos, sobremesas recheadas com cremes, manteiga de amendoim, gelatina, chocolate
<i>Escherichia coli</i> <i>enterohemorrágica</i>	3 a 9 dias	Colite hemorrágica (desenvolvimento posterior de síndrome hemolítico-urémico)	Cólica intensa, dores abdominais, diarreia (inicialmente aquosa, tornando-se sanguinolenta). Menos frequentemente, vômito e febre baixa	8 dias	Carne bovina, crua ou mal passada, queijo e leite cru
<i>Escherichia coli</i> <i>enteroinvasiva</i>	12 a 72 h	Desintéria	Dores abdominais, diarreia, vômitos, febre, calafrios e mal estar generalizado	2 a 9 dias	Queijo
<i>Escherichia coli</i> <i>enteropatogénica</i>	12 a 36 h	Diarreia infantil	Diarreia aquosa, desidratação e desequilíbrio eletrolítico		Leite, carne e frango crus
<i>Escherichia coli</i> <i>enterotoxigénica</i>	12 a 36 h	Gastroenterite	Diarreia		Saladas e vegetais crus
<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	2h a 4 dias	Gastroenterite	Diarreia profusa, dores abdominais, náuseas, vômitos, dor de cabeça, febre e calafrios	2 dias e meio	Pescado cru ou mariscos contaminados
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	3 a 7 dias	Listeriose	Septicemia, meningite, meningo-encefalite, encefalite, infecção intra-uterina ou cervical em gestantes. Os primeiros sintomas são semelhantes aos de uma gripe incluindo febre	2 dias e meio	Leite, queijos (principalmente pasta mole), gelados, vegetais, frango cru e cozido, carnes cruas, enchidos, pescado cru e fumado

			persistente. Em alguns casos, náuseas, vômitos e diarreia		
<i>Clostridium botulinum</i>	18 a 36 h	Botulismo	Fadiga extrema, fraqueza, tonturas, visão dupla, dificuldade progressiva em falar e engolir, boca seca, perda de consciência, paragem respiratória e cardíaca		Em alimentos enlatados e embalados em vácuo, etc. Milho enlatado, pimenta, feijão verde, sopas, beterraba, espargos, cogumelos, azeitonas, atum, frango, fígado de galinha, carnes frias, presunto, lagosta, pescado salgado e fumado
<i>Bacillus cereus</i>	15 min. a 5 h	Forma emética	Náuseas e vômitos	24 a 48 h	Alimento com amido (e.g. arroz, batatas, legumes, feijão, legumes cozidos, puré de batata), arroz e massas
	10 a 22 h	Forma diarreica	Diarreia profusa, dores abdominais e náuseas		Carne, vegetais, pescado e sopas
<i>Clostridium perfringens</i>	8 a 24 h	Intoxicação alimentar	Náuseas, dores abdominais, diarreia e vômito em alguns casos	24 h	Produtos cárnicos
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 a 4 h	Intoxicação estafilocócica	Náuseas, vômitos, dores, abdominais, prostração e, em alguns casos, diarreia  Dores de cabeça, câibras, alterações temporárias da pressão arterial e da pulsação (casos mais graves)		Carnes e derivados, aves, ovos, atum, saladas, bolos com recheio, natas, leite e derivados

## **II. 4 Ferramentas de gestão da segurança alimentar**

### **II.4.1 Legislação nacional relativa à higiene dos géneros alimentícios**

Na União Europeia existe um regulamento denominado “pacote higiene” que engloba 3 atos que instituem regras de higiene para os produtos alimentares. O primeiro ato que diz respeito à higiene dos géneros alimentícios é o Regulamento (CE) n° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, sendo responsabilidade dos empresários deste sector aplicar as medidas de segurança para garantir a sanidade dos géneros alimentícios (3). Este regulamento engloba todos os processos aplicados aos alimentos desde a produção primária até à venda ao consumidor final, no entanto não dizem respeito as questões relacionadas com a nutrição, composição e qualidade dos mesmos (9). O segundo ato é um regulamento específico (Regulamento (CE) n° 853/2004) relativo às regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal e, nesse caso, devem ser estabelecidas normas específicas relativas aos critérios microbiológicos, controlo da temperatura e ao cumprimento da cadeia de frio, à colheita de amostras e às análises (9), (3). Por fim, o Regulamento (CE) n° 854/2004 que estabelece um quadro comunitário para controlo de produtos de origem animal destinados ao consumo humano e regras específicas para carnes frescas, moluscos bivalves, o leite e os produtos lácteos (9), (3). Este “pacote” é complementado também por outros atos como é o exemplo do Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do conselho, de 28 de janeiro, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar e institui a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA – European Food Safety Authority) (3). Este regulamento assegura a qualidade dos géneros alimentícios destinados ao consumo humano e dos alimentos para os animais garantindo assim a livre circulação de géneros alimentícios seguros e saudáveis no mercado (9). A EFSA foi criada em 2002 e tem um papel essencial na avaliação dos riscos em matéria de alimentos e de segurança alimentar, para além disto presta aconselhamento científico, neste caso à Comissão Europeia, do parlamento Europeu e dos Estados-membros da União Europeia, especialmente para apoio nos processos de adoção ou revisão da legislação Europeia (10). O Regulamento (CE) n.º 882/2004 visa assegurar o cumprimento da lei existente em matéria de controlo oficial dos alimentos para consumo humano e para animais e também das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. Este regulamento visa a garantia de comercialização leal dos alimentos quer para animais quer para os seres

humanos e defender os interesses dos consumidores sendo fornecida a informação dos géneros alimentícios por rotulagem ou por outras formas (3). Também pretende minimizar os riscos para os seres humanos e animais quer estes estejam diretamente apresentados ou através do ambiente (9). Existe ainda a Diretiva 2002/99/CE do Conselho, de 12 de Dezembro de 2002 que foi criada no âmbito do “pacote higiene” visando o estabelecimento das regras de colocação dos produtos de origem animal no mercado e também as restrições aplicáveis aos produtos provenientes de países ou regiões terceiros, submetidos a restrições de polícia sanitária (9).

#### II.4.2 Programa de Pré-requisitos

Durante vários anos a produção de alimentos regia-se pelas Boas Práticas de Fabrico (BPF), Boas Práticas de Higiene (BPH) e análise dos produtos finais, sendo estas ferramentas de garantia da obtenção de um produto final estável e seguro (11). Contudo, devido à larga disseminação dos contaminantes nos alimentos, principalmente os perigos biológicos que têm vindo a originar incidentes de extrema gravidade e risco elevado para a saúde dos consumidores, sendo necessária a implementação de sistemas que não visem apenas a análise ao produto final, mas que assentem na base da prevenção ao longo dos processos aplicados aos alimentos, como é o exemplo do HACCP (11). Tem-se verificado que na maioria dos casos detetados não-conformes, a sua origem não está relacionada com falhas na implementação do sistema Análise de

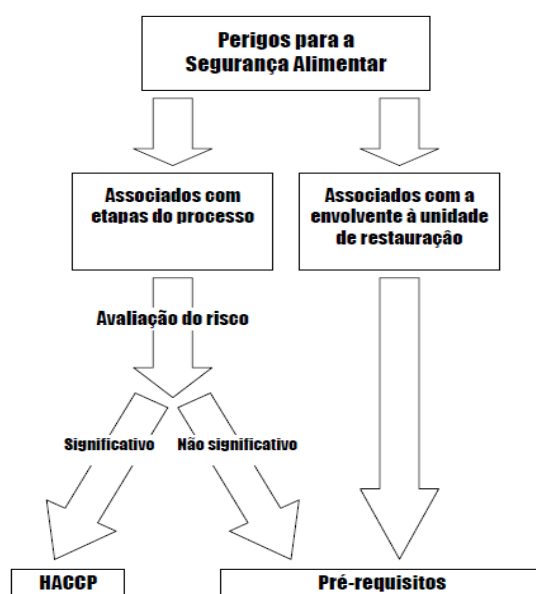


Figura 1 - Diferenciação de perigos não significativos e significativos, e decisão sobre o respetivo controlo, através de pré-requisitos ou do plano HACCP (12).

Perigos e Pontos de Controlo Críticos (HACCP), mas sim no não cumprimento das boas práticas de higiene, daí a importância da aplicação e seguimento dos programas de pré-requisitos. Estes têm um papel essencial no controlo da segurança alimentar pois reduzem a ocorrência de perigos gerais do dia-a-dia na organização. O controlo é atingido se forem cumpridos os Programas de pré-requisitos e o plano HACCP. Os pré-requisitos fornecem as bases para uma efetiva aplicação

do HACCP, pelo que devem ser operacionalizados previamente. Após a implementação dos pré-requisitos, o plano HACCP pode ser desenvolvido e implementado. Nesta fase existe, muitas vezes, alguma confusão sobre se os perigos devem ser controlados pelos pré-requisitos, ou através do plano HACCP. Regra geral, os pré-requisitos devem controlar os perigos associados com a envolvente do estabelecimento alimentar, enquanto o HACCP deverá controlar perigos associados diretamente com o processo, ou seja com as etapas pelas quais os alimentos passam revelem um grau de risco significativo, após avaliação do mesmo (Figura 1) (12). Na Figura 1 à menção aos perigos para a segurança alimentar associados com a envolvente à unidade de restauração, mas este esquema pode ser válido para outros tipos de estabelecimentos da área alimentar. O grau de risco pode ser definido como o produto da probabilidade da ocorrência com a severidade das consequências do risco. Segundo o Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios, antes da aplicação do sistema HACCP, devem ser implementados programas de pré-requisitos que devem seguir todos os requisitos de segurança alimentar. De acordo com a legislação são considerados pré-requisitos HACCP:

- Instalações e equipamento
- Controlo de fornecedores
- Manipulação segura (inclui embalamento e transporte)
- Controlo de resíduos
- Controlo de pragas
- Limpeza e desinfeção
- Qualidade da água
- Manutenção da cadeia a frio
- Saúde e higiene do pessoal
- Formação

Para um controlo eficaz relativamente ao controlo de fornecedores e da limpeza e desinfeção deve ser mantido um sistema de registos adequado, o mesmo se aplica ao caso da manutenção da cadeia a frio sendo necessário para este item também executar monitorização e verificação (11). A verificação de todos os pré-requisitos deve ser efetuada com recurso a Listas de Verificação (*Check lists*), elaboradas de forma a



permitir a avaliação do nível de conformidade com as exigências regulamentares (11). Com uma avaliação quantitativa com base no cálculo das percentagens de cumprimento face a cada requisito, é possível visualizar as situações de não conformidade e identificar os procedimentos em falta, sendo estes parâmetros essenciais para a admissibilidade de aplicação de um plano HACCP (11).

#### **II.4.3 Resumo do Sistema de Análise de Perigos e Pontos de controlo críticos (HACCP)**

O sistema HACCP foi concebido no início da década de 60 por uma empresa americana, a Pillsbury Company em associação com os laboratórios do Exército dos Estados Unidos e com a NASA com o intuito de produzir alimentos seguros para o programa espacial dos Estados Unidos, uma vez que havia a necessidade de garantir que os produtos alimentares desenvolvidos para os astronautas eram livres de patógenos (13). Em 1971, o sistema HACCP foi apresentado pela primeira vez numa conferência sobre segurança alimentar e o primeiro documento que detalhou este sistema foi apresentado em 1973. A *Food and Drug Administration* (FDA) adotou o sistema HACCP como base para o desenvolvimento de normas legais para a produção de alimentos. O uso do HACCP foi recomendado em 1985 pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos em programas de segurança alimentar. Também em 1988 foi sugerida a sua utilização para o controlo de qualidade do ponto de vista higiénico e microbiológico pela Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas em Alimentos (ICMSF – *International Commission on Microbiological Specification for Foods*). Na vigésima reunião de 28 de Junho a 7 de Julho em Genebra, a Comissão do *Codex Alimentarius* incorporou “Diretrizes para aplicação do sistema HACCP”. Nesse mesmo ano a União Europeia procedeu à harmonização das normas gerais aplicadas aos géneros alimentícios, integrando os princípios do Sistema HACCP, através da Diretiva nº 93/43/CEE, do Conselho, de 14 de Junho de 1993 (7) que posteriormente foi substituída pelo Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 (9).

A aplicação do sistema HACCP numa empresa aumenta a confiança e a segurança do consumidor ou do cliente. Também facilita o cumprimento de exigências legais e o uso eficiente de recursos na resposta imediata a questões relacionadas com a salubridade dos alimentos. Podem-se então enumerar como principais benefícios os seguintes itens, o aumento da segurança por parte dos consumidores, o reforço da qualidade do produto

ou do serviço (ou ambos), a redução de custos operacionais, o reforço da imagem do estabelecimento face aos clientes e proporcionar uma evidência documentada do controlo dos processos no que se refere a segurança (cumprimento de códigos de práticas e/ou legislação) (7).

O Sistema HACCP assenta em sete princípios fundamentais:

Princípio 1: Identificação e análise de potenciais perigos associados às fases dos processos. A análise pressupõe a avaliação da probabilidade da ocorrência e da severidade do perigo identificado. São também analisadas eventuais medidas preventivas para o controlo dos perigos e determinação da significância dos mesmos ( (7), (14)).

Princípio 2: Determinação de pontos, procedimentos e passos operacionais que podem ser controlados para minimizar ou eliminar a ocorrência de um perigo, sendo estes passos denominados pontos críticos de controlo (Critical Control Points - CCPs) (14).

Princípio 3: Estabelecimento de limites críticos que devem garantir que os CCP estão controlados.

Princípio 4: Estabelecimento de um sistema de monitorização de controlo dos CCPs através de observação ou medição dos parâmetros de controlo ( (7), (14)).

Princípio 5: Estabelecimentos de ações corretivas quando houver indicação que um determinado ponto de CCP não está sob controlo.

Princípio 6: Estabelecimento de procedimentos de verificação, que incluem testes e procedimentos suplementares, para confirmar a eficácia do sistema HACCP e o cumprimento do plano.

Princípio 7: Estabelecimento da documentação de todos os procedimentos e registos apropriados aos princípios e à sua aplicação. Os registos constituem uma evidência da realização das atividades associadas à operacionalidade do sistema HACCP (7).

#### **II.4.4 Identificação de Perigos Alimentares**

A identificação dos perigos alimentares é o primeiro passo a seguir segundo os princípios em que se baseia o sistema HACCP, daí a importância do conhecimento dos mesmos. Existem três tipos de perigos alimentares, nomeadamente os físicos, químicos

e biológicos. De seguida vai ser feita uma breve apresentação dos perigos alimentares, no entanto vai ser dada mais ênfase aos perigos biológicos pois são estes os que apresentam maior preocupação hoje em dia.

a) Perigos físicos

Os perigos físicos são normalmente fáceis de evitar quando são aplicadas adequada e corretamente as boas práticas de fabrico. Os perigos físicos que ocorrem mais frequentemente são vidros, madeiras, pedras, metais, materiais de isolamento ou de revestimento, ossos, plásticos e objetos de uso pessoal. A contaminação dos alimentos com estes objetos pode decorrer desde as matérias-primas até ao decurso das atividades de armazenamento e transformação a que vão ser sujeitos.

Podem-se destacar então os objetos que estão intrínsecos à própria matéria-prima, tais como ossos em produtos à base de carnes ou mesmo talos em produtos vegetais. Estes devem ser evitados durante o processo de colheita e processamento dos alimentos, devendo existir processos adicionais de inspeção sempre que for necessário para garantir a segurança do consumidor.

Porém, os perigos físicos que são mais frequentes nos alimentos são os que não estão associados às matérias-primas. A sua presença indica que existem falhas no sistema de segurança alimentar e de boas práticas de fabrico e higiene. Estes objetos podem ter origem nas instalações, equipamentos ou utensílios; nos operadores que manipulam os alimentos direta ou indiretamente; nos materiais de embalagem; nas atividades de manutenção; nas atividades de higienização dos equipamentos e instalações e por fim através de pragas.

Normalmente a presença de objetos estranhos presentes nos produtos alimentares não apresentam um risco muito grave para a saúde do consumidor, até porque por vezes os objetos são encontrados antes de serem ingeridos. Por outro lado, se os objetos forem de pequenas dimensões e cortantes, podem apresentar desde pequenos danos na boca do consumidor até problemas mais graves como cortes ou perfurações em órgãos internos que podem levar a hemorragias. Os plásticos apresentam maior risco para as crianças uma vez que os órgãos responsáveis pela deglutição são mais pequenos do que nos adultos e estes objetos podem causar asfixia, e consequentemente a morte (2).

## b) Perigos químicos

Os perigos químicos nos alimentos podem estar associados a produtos químicos adicionados aos géneros alimentícios, naturalmente presentes no alimento na sua composição ou serem criados pelo processamento dos alimentos. Os perigos químicos são regra geral os mais temidos pelo consumidor. Os principais grupos de perigos químicos para a segurança alimentar são:

- Aditivos alimentares;
- Metais;
- Pesticidas e resíduos de medicamentos;
- Toxinas naturais;
- Químicos criados pelos processos;
- Alergénicos.

O controlo deste tipo de perigos pode passar pelas boas práticas, nomeadamente a adoção de esquemas de produção integrada na produção primária, análises periódicas ao género alimentício, tal como despiste de pesticidas no controlo de água de captação própria, adoção de materiais próprios para o contacto com alimentos, entre outros.

## c) Perigos biológicos

Comparando com os perigos físicos e químicos, os biológicos são os que apresentam maior risco à inocuidade dos alimentos (2). Este grupo inclui bactérias, fungos, vírus, parasitas patogénicos e toxinas microbianas. A presença destes nos alimentos está habitualmente associada a más práticas dos manipuladores ou então aos produtos crus contaminados que sejam utilizados. Alguns microrganismos podem estar presentes naturalmente no alimento devido ao local onde este é produzido mas que pode ser eliminado por processos térmicos ou mesmo a quando da sua confeção. Por vezes a confeção dos alimentos não é bem executada, podendo sobreviver alguns microrganismos que podem apresentar risco para a saúde do consumidor. A contaminação por este tipo de perigo pode também ser prevenida com a aplicação de boas práticas nas operações de embalagem, armazenamento e transporte dos alimentos.

As bactérias são microrganismos microscópicos que se encontram em toda a parte, sendo que a maior parte destas não são patogénicas. Nos humanos, estas estão presentes em todas as mucosas tais como a nasal, em toda a pele, no sistema digestivo. Algumas bactérias são benéficas, sendo utilizadas em alimentos tais como iogurtes, queijo e cerveja, ao passo que outras causam o apodrecimento dos alimentos não sendo estas causadoras de doenças. É importante fazer a distinção entre bactérias patogénicas de bactérias que causam o apodrecimento dos alimentos, uma vez que as patogénicas geralmente não são detetáveis à vista, ao olfato ou ao sabor e muitas das vezes consideram-se que os alimentos com mau aspeto e que estão deteriorados é que são os que provocam doenças (1). As bactérias são denominadas, de um modo geral, de patogénicas todas as que causam doenças, sendo esta designação abrangente não só para as bactérias que causam doenças infecciosas mas também para as doenças provocadas por toxinas produzidas por bactérias. De uma forma mais rigorosa, só são consideradas patogénicas as bactérias que provocam infeções a humanos enquanto as que provocam intoxicações por via das toxinas são denominadas de bactérias toxigénicas (2). As doenças causadas por bactérias podem ser classificadas de três formas:

- Infeção: a infeção acontece quando as bactérias patogénicas são consumidas no alimento ainda vivas, e conseguem sobreviver ao ambiente ácido do estômago (pelo menos uma parte delas), e passam para o intestino e começam a crescer. A infeção acontece quando as bactérias se multiplicam até um determinado número que é variável dependendo da virulência e da estirpe da mesma e do organismo do indivíduo em causa (se está doente ou se é imunodeprimido, etc) (1).
- Intoxicação: neste caso não é a bactéria em si que produz a doença mas sim a toxina ou químico produzido por ela. A bactéria já pode estar morta quando o alimento for consumido, mas se anteriormente teve oportunidade de crescer e produzir toxina suficiente, esta vai ser ingerida juntamente com o alimento e consequentemente provoca a intoxicação no indivíduo (1).
- Toxinfecção: esta forma é uma conjugação das duas anteriores, só que neste caso o microrganismo é ingerido vivo e a toxina é produzida no intestino do indivíduo. Apesar de o organismo ser ingerido e de se multiplicar no intestino não é este que provoca a doença mas sim a toxina produzida pela mesma (1).

Algumas bactérias são extremamente virulentas, de tal forma que, bastam apenas duas para causar infeção, no entanto existem casos em que são necessárias milhares.

Independentemente do número é necessário que existam condições para que haja crescimento. Os ambientes propícios ao crescimento bacteriano são ambientes com muita água, ou seja atividade da água ( $a_w$ ) elevada, gamas neutras de pH podendo também a maior parte suportar ambientes ligeiramente ácidos ou alcalinos (entre 4,5 a 9), a temperatura a que a maior parte destas cresce é entre os 20°C e os 45°C. Estas são as condições gerais ótimas para o crescimento bacteriano, no entanto, ao longo dos anos as bactérias têm desenvolvido formas para conseguirem sobreviver em condições mais extremas em resposta à tentativa de conservação dos alimentos, já são verificados casos em que algumas bactérias conseguem crescer a temperaturas de refrigeração ou temperaturas acima dos 45°C, em pH muito baixo ou elevado. Outra condicionante do crescimento bacteriano é o oxigénio, sendo que algumas necessitam de oxigénio para viver e crescer (aeróbias) enquanto outras crescem apenas o fazem na ausência deste (anaeróbias), e existem ainda bactéria designadas de anaeróbias facultativas que podem crescer na presença ou ausência de oxigénio, mas normalmente têm preferência por um destes casos. Existe o caso especial apenas de algumas bactérias que apresentam a capacidade de produzir esporos. Estes, são estruturas mais resistentes do que a célula vegetativa que lhe dá origem, sendo que em condições adversas nomeadamente falta de nutrientes para a manutenção da atividade essencial à sobrevivência ou temperaturas muito elevadas, as bactérias libertam os esporos. Os esporos são resistentes a temperaturas muito elevadas e também à radiação e a desinfetantes devido à sua constituição em cálcio e ácido dipicolínico (DPA) (15). Quando houver condições propícias, os esporos germinam e dão origem a uma nova célula vegetativa.

Nas últimas décadas os vírus têm apresentado como um problema nas doenças diarreicas (13). A transmissão ocorre por contato com esgotos e águas contaminadas com matéria fecal ou o contato direto com material fecal humano. Por outras, são o caso mais associado a doenças provocadas por alimentos uma vez que são despejados no mar esgotos tratados e não tratados, se estes contiverem vírus os bivalves filtram a água e armazenam os contaminantes da parte comestível. Outra forma de contaminação é por trabalhadores na área de manipulação de alimentos que se tiverem poucos cuidados de higiene durante o manuseamento e estiverem contaminados podem também contaminar os alimentos, por isso o uso de uma fonte de água limpa e a lavagem frequente das mãos é muito importante. Os vírus patogénicos não são tão bem conhecidos pelos cientistas como são as bactérias. Não existem bons métodos laboratoriais para a deteção de vírus,

e por isso, não havendo métodos de teste rápidos, fáceis e baratos não é possível estudar como os vírus são transmitidos, o número de pessoas que são infectadas com vírus provenientes dos alimentos, ou mesmo quais os melhores métodos para os controlar (1). Alguns exemplos de vírus transmitidos por alimentos são os da hepatite A, Norwalk e tipo Norwalk, rotavírus, astrovírus e enterovírus (13).

Os parasitas são organismos que necessitam de um hospedeiro vivo para sobreviver e crescer. Os parasitas associados a doenças transmitidas por alimentos podem-se dividir em 3 grupos, protozoários intestinais, protozoários de tecidos e helmintes de tecidos. As principais vias de transmissão destes organismos são ingestão via feco-oral por águas contaminadas ou falta de higiene no manuseamento dos alimentos e por tecidos animais contaminados mal cozinhados. Se houverem boas práticas de higiene nos processos pelos quais o alimento tem de passar, condições apropriadas de confeção e também de congelamento ou mesmo até tratamentos por radiação a presença destes microrganismos pode ser controlada nos alimentos. Este controlo é muito importante uma vez que basta um organismo destes ser ingerido para provocar doença. Alguns exemplos dos parasitas são *Acanthamoeba* spp., *Anisakis simplex*, *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayentanensis*, *Diphyllobothrium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Eustrongylides* spp., *Giardia lamblia*, *Nanophyetus* spp., *Sarcocystis hominis/suihominis*, *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* e *Trichuris trichiura* (13).

As leveduras e bolores são os organismos do grupo dos fungos e têm elevada importância em segurança alimentar, no entanto os fungos filamentosos também merecem uma especial atenção principalmente no setor agrícola. Os fungos, tal como as bactérias, necessitam de condições propícias para o seu desenvolvimento. Comparando ainda com as bactérias, num pH na gama do neutro os fungos crescem mais lentamente do que as bactérias, apresentando estes, crescimento mais elevado em ambientes mais ácidos. Ao contrário da maioria das bactérias os fungos também se caracterizam por crescerem em ambientes com baixa atividade de água. Pode-se então concluir que os alimentos mais ácidos e com menor atividade de água, quando as condições de armazenamento não forem as mais indicadas, vão ser mais propícios à contaminação pelos fungos, como é o caso de sumos de frutos frescos, frutos, vegetais, queijos, cereais, alimentos salgados, alimentos acidificados, e alimentos secos (2). As leveduras na maior parte são considerados organismos que não são prejudiciais, estão

normalmente associados à decomposição dos alimentos, podendo estes também ser indicadores das condições de higiene nas unidades da indústria alimentar (2).

Os bolores e os fungos filamentosos podem ser perigosos pois alguns destes são produtores de micotoxinas, não podendo estas ser removidas do alimento após a sua produção. A presença dos fungos filamentosos e dos bolores na indústria agrícola é encarada com alguma naturalidade pois estes são muito fáceis de ocorrer, no entanto é necessário que a sua presença seja controlada para que não haja produção de micotoxinas (2). Outro caso em que estes podem apresentar perigo é no caso da alimentação de animais, que têm na sua composição compostos que aumentam a suscetibilidade da contaminação por fungos e pode ser perigoso, uma vez que normalmente os animais não têm uma alimentação muito diversificada, e o consumo continuado de rações contaminadas com micotoxinas podem trazer problemas de saúde crónicos (2). Nos humanos isto não é tão verificado uma vez que o tipo de alimentação é muito mais diversificado. No entanto existem algumas micotoxinas que apresentam elevado risco para a saúde humana (2).

#### **II.4.5 Importância das análises microbiológicas no controlo de sistemas HACCP**

Na implementação do sistema HACCP é necessário um plano de amostragem e análises, que consiste na recolha e análise microbiológica de amostras do produto e matérias-primas (7). As análises microbiológicas são uma ferramenta essencial não só para o controlo da segurança alimentar, bem como, para o controlo das condições de higiene dos manipuladores, das superfícies e dos utensílios pelos quais os alimentos são submetidos durante o seu processamento. Logo, as análises microbiológicas vão indicar a eficiência da aplicação do Plano HACCP, assegurando que os limites microbiológicos não sejam ultrapassados (7). Para cada tipo de estabelecimento da área alimentar deve ser realizado um plano pré-estabelecido de análises microbiológicas adequado, tendo em consideração a natureza dos alimentos, dos processos aplicados aos alimentos e o nível de risco associado às matérias-primas e produtos alimentares (7). A metodologia associada à deteção de microrganismos mais utilizada para as análises microbiológicas, é denominada por “método convencional” (16). Este método consiste na deteção microbiana através da indução do crescimento de um microrganismo alvo formando colónias num meio de cultura (16). Existem outros métodos mais rápidos, ou seja, necessitam de menos tempo para identificação do microrganismo, no entanto estes métodos são mais dispendiosos exigindo equipamentos mais sofisticados. As análises



microbiológicas normalmente executadas aos alimentos, são relativamente aos microrganismos indicadores e aos microrganismos patogénicos (16). As análises de rotina a alimentos, para uma vasta gama de microrganismos patogénicos, é impraticável não só devido à inexistência de equipamento inadequado na maioria dos laboratórios mas também porque o tamanho da amostra seria impraticável de manipular. Como tal, tornou-se uma prática normal fazer a análise a bactérias cuja sua presença indica a possibilidade de intoxicação alimentar ou a presença de outras bactérias patogénicas, daí a denominação destes microrganismos como “indicadores” (16). Estes microrganismos são frequentemente considerados como sendo de grande importância na avaliação da segurança microbiológica e da qualidade dos alimentos (16). As principais bactérias implicadas como indicadoras são os coliformes, *enterococci*, *Enterobacteriaceae*, contagem de viáveis totais, bolores e leveduras. Relativamente aos microrganismos patogénicos, as análises que são mais comuns de serem efetuadas são à *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. As características dos microrganismos e metodologias de análise aos microrganismos acima mencionados vão ser descritas no capítulo seguinte na secção das análises microbiológicas (da página 41 à 45).



# III

## CAPÍTULO III. Atividades desempenhadas no estágio

Neste capítulo serão abordadas as atividades desempenhadas no estágio. Podem-se distinguir três partes.

- 1) Descrição do acompanhamento da acreditação do laboratório usando como base de estudo a NP EN ISO/IEC 17025 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”;
- 2) Análises microbiológicas realizadas no laboratório bem como a recolha dos alimentos, águas e zangadoas;
- 3) Apresentação do caso de estudo, “Impacto da contaminação de alimentos prontos a comer na saúde pública” que inclui a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir analisados no laboratório, bem como a relação entre dados de toxinfecções alimentares na mesma área geográfica (região centro) em que foram recolhidos os alimentos analisados.

### III.1 Acompanhamento da acreditação do laboratório – NP EN ISO/IEC 17025

O laboratório do YourLAB Segurança Alimentar foi construído de forma a obedecer às normas de referência com o intuito de posteriormente ser um laboratório acreditado. A acreditação consiste no reconhecimento da competência técnica de entidades, para executar determinadas atividades de avaliação da conformidade como sejam calibrações, ensaios, certificação e inspeção. Todas as metodologias de ensaio (ME), instruções de trabalho (IT's) relativas a calibrações, limpeza de material, controlo ambiental, higienização das instalações, e etc, são executadas segundo metodologias de ensaios elaboradas pela diretora técnica do laboratório que se baseiam em documentos de referência.

De seguida vai ser apresentado um resumo do conteúdo da NP EN ISO/IEC 17025 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”, sendo descrito o que deve ser feito pelos laboratórios para uma correta aplicação desta norma para atingirem os objetivos propostos pela mesma e que seja possível a acreditação.

Em termos de conteúdo esta norma pode ser dividida em **Requisitos de Gestão**, de que são exemplos a Organização, Sistema de qualidade, Auditorias internas, Revisão

pela Direção, Controlo de documentos e de registos, Aquisição de produtos e serviços, Controlo de trabalhos de ensaios e/ou de calibrações não conformes (17) e **Requisitos Técnicos**, de que são exemplos o Pessoal, Instalações e condições ambientais, Equipamento, Métodos de ensaio, de calibração e validação de métodos, Rastreabilidade das medições. Amostragem, Manuseamento dos itens a ensaiar ou calibrar (17).

### **III.1.1 Requisitos de Gestão**

a) Quanto à organização, deve estar disponível o(s) organigrama(s) atualizado(s) e aprovado(s) que evidencie(m) a inserção do laboratório na estrutura da entidade onde se integra, quando aplicável, discriminando as relações interdepartamentais e hierárquicas que afetem a independência, a confidencialidade e a competência técnica relativa ao trabalho desenvolvido pelo laboratório, a organização interna do laboratório, identificando, por exemplo, setores ou unidades técnicas e respetivos responsáveis, cargos ou postos de trabalho e relações hierárquicas e a integração dos órgãos responsáveis pela função Qualidade na estrutura do laboratório (e entidade em que eventualmente se integre) (17).

b) Quanto ao sistema de gestão, todos os documentos (procedimentos, normas, instruções, etc.) devem estar escritos numa linguagem acessível e compreendida por quem os utiliza, pelo que poderá ser necessário efetuar traduções de línguas estrangeira sempre que necessário. O Manual da Qualidade (MQ) será elaborado tendo em vista explicar para terceiros a forma como o laboratório funciona e se organiza. A gestão de topo é aquela que tem a autoridade para gerir os bens e recursos do laboratório necessários à obtenção e manutenção da sua acreditação (17).

c) Quanto ao modo de controlo dos documentos, considera-se que os documentos estão disponíveis, se estiverem presentes no local ou fácil e diretamente acessíveis. Os documentos obsoletos podem estar identificados, por exemplo, através de carimbos, etiquetas, grafismos. Recomenda-se que o prazo de arquivo para documentos técnicos e da qualidade seja, pelo menos, até ao final do 3º ano civil (17).

d) Como aquisição de produtos e serviços, apresentam-se como exemplos de produtos relevantes os padrões, o material de referência certificado (MRC), os equipamentos de medição e ensaio; e como exemplo de serviços relevantes as subcontratações e as calibrações. O laboratório deve documentar os critérios de aceitação/rejeição para os produtos e serviços relevantes. O responsável pela verificação

e aprovação do conteúdo técnico dos documentos de compra deve ter as competências técnicas suficientes para o desempenho da função. A avaliação de fornecedores pode incluir, por exemplo, a realização de uma auditoria ou uma apreciação dos serviços prestados face a critérios estabelecidos (17).

e) As Auditorias Internas servem para detetar e corrigir as deficiências no caso de existir desproporção entre a gravidade das deficiências encontradas nas auditorias internas e nas auditorias do Instituto Português de Acreditação (IPAC), isso pode ser interpretado que o laboratório não dedica a devida atenção às auditorias internas ou que estas não são eficazes. O ciclo de auditoria interna deve ser efetuado intervalos de 12 meses. O “programa” de auditorias internas pressupõe a existência de um planeamento ou cronograma das ações a realizar. Estas auditorias podem ser efetuadas por elementos do próprio laboratório (ou da entidade onde se insere) ou de uma entidade externa, desde que as auditorias sejam eficazes, a iniciativa de desencadear e fechar as auditorias pertença ao laboratório e os auditores estejam devidamente qualificados (17).

O laboratório deve evidenciar que todos os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025 e todas as áreas técnicas abrangidas ou a abranger pela acreditação são auditadas num ciclo de auditoria interna (17).

### **III.1.2 Requisitos Técnicos**

a) Quanto ao pessoal, para que se garanta a sua competência, devem estar definidas num documento (incluído ou referenciado no manual de qualidade (MQ)) as qualificações mínimas exigíveis para os diferentes cargos/postos de trabalho/funções do laboratório, designadamente o Responsável Técnico (RT) que deve ter experiência, o Responsável da Qualidade (RQ) e os estagiários (ou outros elementos eventuais) são considerados como pessoal adicional e/ou em formação, pelo que deve ser evidenciada a responsabilidade pela supervisão dos mesmos, quando estes estejam envolvidos em tarefas com implicações no âmbito da acreditação do laboratório (17).

b) O laboratório pode realizar os ensaios/calibrações em diferentes tipos de instalações como por exemplo instalações permanentes (usadas por períodos de tempo superiores a três anos) caso trabalhe em instalações alugadas ou cedidas, devem estar definidas e descritas as condições que regulamentam esta situação, instalações temporárias (instalações utilizadas por um período de tempo inferior a três anos), instalações móveis (normalmente localizadas em meios de transporte ou transportáveis)

para serem abrangidas pela acreditação, é necessário existir uma instalação permanente (sede) e instalações do cliente ou definidas pelo cliente (ensaios no local) (17).

c) Quanto aos Métodos de Ensaio e Calibração e Validação dos Métodos, o laboratório deve definir quais ensaios e ou calibrações que pretende incluir no âmbito da acreditação. O laboratório deve evidenciar experiência prática na realização de ensaios/calibrações segundo os métodos que pretende acreditar ou para os quais está acreditado, a fim de permitir avaliar e comprovar a competência e familiarização com os mesmos. No caso de calibrações, a definição do âmbito da acreditação inclui a atribuição da Melhor Incerteza, de acordo com o conceito estabelecido. O IPAC recomenda a utilização de métodos normalizados sempre que disponíveis. A utilização de métodos internos (desenvolvidos pelo laboratório) exige, obviamente, a respetiva validação (17).

d) Relativamente à Estimativa da Incerteza de Medição, os princípios, metodologia e terminologia a seguir pelo laboratório para o cálculo de incertezas em calibrações, devem estar em conformidade com o documento E-A4/02 - "*Expression of the uncertainty of measurements in calibration*". É expectável que a incerteza estimada se aproxime da correspondente Melhor Incerteza (sem nunca ser inferior), devendo o laboratório poder justificar quando tal não suceda. Os princípios, metodologia e terminologia a seguir pelo laboratório para efetuar o cálculo ou a estimativa de incertezas em ensaios, estão definidos no documento EA4/16 - "*EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing*". O laboratório deve possuir registos da implementação da estimativa de incertezas (17).

e) Quanto ao Controlo de Dados e Validação do *Software*, considera-se que quando o laboratório recorre a *software* comercial para efetuar cálculos, a configuração ou as eventuais modificações introduzidas no mesmo devem ser validadas. A validação do *software* desenvolvido pelo laboratório pode ser feita, por exemplo, pela descrição das fórmulas e algoritmos usados e uma comparação representativa das respostas dadas pelo computador/sistema automatizado com as expectáveis face à introdução de um conjunto conhecido de dados. O recurso a assinaturas eletrónicas deve cumprir as regulamentações aplicáveis (17).

f) Recomenda-se que a metodologia de manutenção dos Equipamentos contemple, pelo menos, um processo de registo do histórico das manutenções, manuseamento de um equipamento após ter sido sujeito a influências que possam causar dúvidas sobre a sua integridade, determinação dos efeitos em calibrações ou ensaios anteriores, o modo

de identificação do seu estado operacional, inclusive quando fora de serviço e o local do equipamento enquanto permanecer em manutenção ou fora de serviço. Devem existir critérios de aceitação/rejeição (nomeadamente valores máximos ou mínimos aceitáveis, face aos fins e usos a que se destinam os equipamentos) que permitam analisar os resultados das calibrações e/ou verificações efetuadas e tomar decisões quanto ao seu uso (apto, uso parcial ou restrito, reclassificação, aguarda reparação ou ajuste ou retirada de serviço). Recomenda-se que, na ausência de outra especificação (imposta por documento normativo, regulamento, etc.), seja usado o seguinte critério de aceitação da calibração: a soma do módulo do resultado da medição com o módulo da incerteza associada seja inferior ou igual ao valor máximo aceitável (VMA) para o equipamento isto é,  $|\text{erro}| + |\text{incerteza}| \leq |\text{VMA}|$ . Considera-se apropriada a existência de um plano de manutenção preventiva (17).

g) Quanto à Verificação de Equipamento o laboratório deverá proceder-se à verificação intermédia das características dos equipamentos entre calibrações de modo a controlar e conhecer a sua deriva e aptidão ao uso. A periodicidade deste controlo (exemplo: diário, semanal, etc.) será estabelecida pelos seguintes fatores, experiência prévia através da análise de calibrações anteriores; recomendações do fabricante; dados indiretos sobre o comportamento do equipamento (ex.: manutenção, comparações interlaboratoriais, etc.); frequência, tipo e condições de uso do equipamento; condições ambientais (temperatura, humidade, vibração, etc.) e grau de exatidão pretendido (17).

h) Relativamente à Rastreabilidade das Medições, a calibração e verificação dos equipamentos devem ser entendidas como um meio (e não como um fim) de garantir a sua aptidão para efetuar medições. Considera-se que devem ser sujeitos a calibração/verificação equipamentos que sejam suscetíveis de influenciar diretamente os resultados dos ensaios/calibrações e que sejam referidos nas normas de ensaio/calibração como calibrados e /ou verificados ou cuja calibração e/ou verificação seja requerida. O laboratório deve evidenciar que, para estes equipamentos, dispõe de um programa (ou plano) de calibrações/verificações atualizado e com a informação considerada relevante (17).

i) Os Materiais de Referência são uma ferramenta extremamente importante para avaliar a qualidade dos resultados obtidos e podem ser usados na validação de métodos, calibração, estimativa de incertezas de medição, treino de colaboradores e controlo da qualidade. Consideram-se como fornecedores de MRC competentes aqueles que estejam acreditados por um organismo de acreditação signatário do Acordo Multilateral da

*European cooperation for Accreditation/International Laboratory Accreditation Cooperation (EA/ILAC)*, que sejam Laboratórios Nacionais de Metrologia (por exemplo: *National Institute for Standards and Technology - NIST*) e que sejam reconhecidos nacional ou internacionalmente no setor técnico (por exemplo: *Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)*, *International Atomic Energy Agency (IAEA)*) (17).

j) Quanto à Amostragem, interpreta-se que a designação de amostragem não se refere à preparação da amostra ou item recebido para ensaio/calibração, mas sim à sua recolha. Apenas serão auditados os requisitos associados a esta atividade se ela estiver especificamente incluída no âmbito da acreditação. Considera-se como “razoável” a utilização de métodos estatísticos quando não for feita amostragem a 100% ou quando exista influência da homogeneidade do produto sobre os resultados (17).

k) Relativamente ao Manuseamento dos Itens a Ensaiar ou Calibrar, o termo “itens” pode ser entendido como produtos, amostras, materiais a ensaiar ou equipamentos a calibrar, consoante aplicável. Considera-se implícita a existência de um sistema para registo de entrada dos itens a serem ensaiados/calibrados. Considera-se apropriado fazer subdivisão de amostras, por exemplo, quando a amostra tem de seguir para diferentes locais de ensaio/calibração simultaneamente (química e microbiologia). Considera-se implícito que o laboratório defina as condições “normais” ou “anormais” de receção de itens quando não estejam indicadas nas normas de ensaio/calibração (17).

l) Quanto à Garantia da Qualidade dos Resultados de Ensaios e de Calibrações, a metodologia de Controlo de Qualidade adotada deve estar descrita em documentos incluídos ou referenciados no Manual de Qualidade. A deteção de tendências pode ser feita através de cartas de controlo. Os laboratórios devem cumprir as disposições para a participação em ensaios de aptidão e outros exercícios de comparação interlaboratorial. O laboratório deve analisar os resultados da sua participação num ensaio de aptidão ou comparação interlaboratorial atempada e periodicamente e sempre que o desempenho seja considerado insuficiente ou inaceitável, deve desencadear o procedimento de controlo (17).

m) A Apresentação dos Resultados quantitativos de ensaios químicos deve ser clara, por exemplo, ao assinalar “não detetado” (ou “não quantificado”), deve ser indicado também o valor do limite de deteção (ou de quantificação) obtido para o ensaio em causa. O nº de algarismos significativos usado no resultado deve ser coerente com as orientações dadas na norma ou documento normativo de ensaio correspondente; a



incerteza estimada para o resultado (na ausência da estimativa da incerteza em ensaios, a apresentação deve ser coerente com a variabilidade e dispersão de resultados observadas para aquele ensaio/tipo de ensaio). O uso de algarismos significativos em excesso induz uma falsa confiança no cliente, e o uso de algarismos significativos insuficientes não transmite toda a informação válida de que o laboratório dispõe (17).

O laboratório YourLab Segurança Alimentar funciona de forma a cumprir os objetivos propostos pela norma. Em anexo (Anexo 1) está numa tabela todas as instruções de trabalho, procedimentos e metodologias bem como os documentos de referência como é proposto pela norma.

### **III.2 Serviços efetuados no laboratório**

O laboratório YourLab Segurança Alimentar dispõe de diversos serviços nomeadamente recolha e de análise microbiológica a alimentos e águas, controlo de higienização e validação e controlo. Este último consiste na realização de estudos nutricionais em alimentos, a avaliação de produtos nas várias fases de processamento, validação de processos letais (térmicos/desinfecção), diagnóstico de problemas e elaboração de pareceres técnicos e estudos de prazo de validade. Durante o estágio não houve oportunidade de desenvolver este serviço no entanto desenvolveram-se as atividades relacionadas com os outros serviços disponíveis pelo laboratório. Os alimentos podem chegar ao laboratório para serem analisados, quer por entrega imediata pelas empresas interessadas quer por recolhas efetuadas por parte do laboratório por técnicos competentes. Para além da análise aos alimentos, pode, e normalmente é feito, um controle de higienização ao local de onde foi recolhido o alimento, em que é feita uma zaragatoa a um manipulador e outro a uma superfície e/ou material. Depois da amostra chegar ao laboratório, é-lhe atribuída uma referência em número para que não seja perdida a relação entre a amostra e o local de onde esta foi recolhida. A amostra é então preparada, sendo usados meios de cultura adequados a cada análise. De seguida é feita a inoculação da amostra, que vai incubar durante o tempo e temperatura adequados e por fim é feito o registo dos resultados.

#### **III.2.1 Amostragem e receção das amostras**

O termo amostragem diz respeito a todo o processo que implica a recolha da amostra até à chegada ao laboratório.

a) Plano de recolha de amostras

O laboratório YourLab não dispõe de um plano de recolha de amostras elaborado internamente. Este trabalho está confinado às empresas que fazem a gestão do sistema de segurança alimentar dos estabelecimentos onde vai ser recolhida a amostra, sendo o laboratório responsável apenas pela prestação do serviço.

A única planificação existente por parte do laboratório é a gestão das recolhas requisitadas por empresas interessadas nos serviços do laboratório, de forma que seja possível executar as recolhas da forma mais eficiente possível. São tirados dois ou três dias por mês, conforme o plano de recolhas que foi apresentado para cada mês ao laboratório, para efetuar as recolhas. É essencial que seja planeado o percurso a fazer nesses dias para que seja possível executar todas as recolhas propostas para esse dia.

Os proprietários dos estabelecimentos são avisados previamente do dia da recolha. Normalmente programam-se as recolhas das amostras que não são refeições fora da hora de almoço. As refeições têm de ser recolhidas se possível logo após a sua confeção, daí a importância de resguardar a hora de almoço para recolha destas amostras, para que não haja alteração da mesma por um tempo elevado de espera, o que pode levar ao desenvolvimento de microrganismos devido ao arrefecimento da refeição.

Outro aspeto que também entra na programação do dia das recolhas é o tipo de amostras a ser recolhido em cada estabelecimento. É importante esta programação para que seja levado todo o material necessário para a recolha em causa para que não falte nenhum material.

Na Figura 2 é apresentado um exemplo do que foi referido a cima. Os nomes dos estabelecimentos, as moradas e contatos são fictícios para garantir confidencialidade dos clientes.

Recolha 9 de Março					
	Estabelecimento	Morada	Contato	Nome do proprietário	
7h	Hora de partida				
9h	Pastelaria Doce pastel	Vila do Pinhal - Póvoa de Midões	9629836187	Sr. António Reis	3 zarag + 1 prod + 1 ag
10h	Fabrico de Pastelaria	Chamusca da Beira EN 17 nº27	238 602 332/	Sr. Manuel	2 zarag + 1 prod + 1 ag
15	Manuel Antunes	3400 Oliveira do Hospital	968705826		
10h	Frutas Reis	EN 17 Quinta do Justiceiro - São Paio de Gramaços - Catraia de São Paio	964 163 469	Sr. Rodrigo	2 zarag
10h	Frutas Amália Rosa	Zona Industrial de Oliveira do Hospital	965 011960	Sra. Amália	2 zarag + 1 prod + 1 ag
45	Margarida Santos - minimercado fruit fresh	Rua do Amial nº 34 - Oliveira do Hospital	238 164 957	D. Margarida	2 zarag + 1 ag
	Pastelaria Ribeirinho	Rua Fernando Pessoa 3400 - 129 Oliveira do Hospital	239523833	Sr. Manuel	2 zarag + 1 prod + 1 ag
	Café do Caminho Fundo	EN 17 n.º 13 Vendas de Galizes – Oliveira do Hospital	238 5557 321	Sr. Horácio	2 zarag
12h	Restaurante Tó Zé	Rua Virgílio Ferreira nº 76 Vale do Ferreiro 3400 Oliveira do Hospital	238 694627	Sr. António José	2 zarag + 1 prod + 1 ag
12h	Centro Social de Alegria	Midões - Rua da Capela / Póvoa de Midões - Av. Santa Isabel	965276841	Drª Anabela	2 zarag + 1 prod + 1 ag
12h	Helena Figueiredo - rest. A comidinha deliciosa	Midões –Rua das Oliveiras nº17	914865642	Srª Helena	2 zarag + 1 prod + 1 ag
13h	Agrupamento de Escolas da Cordelinha - Erva da Beira	Rua dos Carpinteiros 3405-062 Ervedal da Beira	238641535	Prof. Carvalheira	3 zarag
13h	Ricardo Teixeira - Café do Centro	Rua Dr. João Taborda Vila Franca da Beira	238 644 543	Sr. Ricardo	2 zarag
13h	Queijaria Quinta da Serrinha	Rua António Bernardin, n.º30 Seixo da Beira	912912876	D. Dulce	3 leites
14h	Fernado Inácio	EN nº2 3440 Viseiras - Santa Comba Dão	232891951	Sr. Fernando	2 zarag. + 1 prod + 1 ag
16h	Floripes & Henriqueta, Lda	Estrada de São Agostinho - Penacova	967 454 731/ 239 476 112	Sra. Floripes	2 zarag
00					Total
					30 zarag
					8 prod
					9 ag

**Figura 2 - Exemplo da programação de um dia de recolhas no laboratório Yourlab Segurança Alimentar.**

b) Tipos de estabelecimentos onde são efetuadas as recolhas de amostras para análise

Os estabelecimentos onde são feitas as recolhas de amostras para análise são restaurantes, cantinas municipais, Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS's), padarias, pastelarias, queijarias, snack bares, talhos, empresas hortícolas, empresas de congelados, peixarias, frutarias, minimercados, bares de escolas. Na Tabela 4 são apresentados os tipos de estabelecimentos onde são efetuadas recolhas pelo laboratório, bem como alguns exemplos do tipo de amostras que se podem recolher nos mesmos.

**Tabela 4 - Estabelecimentos onde são efetuadas recolhas pelo laboratório YourLab Segurança Alimentar.**

Tipos de estabelecimentos	Amostras recolhidas		
	Produtos	Zaragatoas	Águas
Restaurantes	Refeições mistas Carne ou peixe com acompanhamento de batata, massa, arroz, ou legumes. Sopa	Manipuladores. Superfícies e/ou utensílios, exemplos: bancadas de trabalho, talheres, superfícies que estejam em contacto com os alimentos.	Torneiras utilizadas na lavagem dos alimentos, higienização do material ou dos manipuladores, para a confeção dos alimentos.
Cantinas municipais			
IPSS			
Padarias	Pão, broa.		
Pastelarias	Pastéis com ou sem creme.		
Snack Bares	Petiscos, sandes.		
Queijarias	Queijos, leite.		
Talhos	Carne ou charcutaria.		
Peixarias	Peixe.		
Frutarias	---		
Empresas Hortícolas	Legumes embalados.		
Empresas de congelados	Produtos congelados.		
Minimercados			
Bares de escolas	Sandes, pasteis.		

c) Tipos de amostras

As amostras recolhidas podem ser de diferente natureza. Os tipos de amostras que se recolhem são alimentos, podendo estes serem já prontos a consumir ou ainda não confeccionados, águas e zaragatoas a manipuladores e superfícies.

Os alimentos analisados no laboratório podem ser alimentos prontos a consumir, onde se incluem refeições recolhidas de restaurantes, cantinas, infantários e lares; pastéis de pastelarias, cantinas, escolas e cafés; pão de padarias; queijos de queijarias, e

petiscos em cafés. Outros alimentos que também são analisados, são o caso de carnes cruas de vaca e porco, enchidos, peixe, rissóis, croquetes, chamuças e outros tipos de salgadinhos (não confeccionados) e massa de pão. Todos estes alimentos são recolhidos em sacos estéreis e mantidos numa mala térmica com termoacumuladores até à chegada ao laboratório onde são colocados num frigorífico. A análise é feita no próprio dia ou no seguinte.

As águas normalmente são recolhidas por profissionais do laboratório uma vez que os procedimentos de recolha são um pouco mais complexos do que no caso dos alimentos e é necessário que a recolha seja bem executada para a amostra não ser contaminada durante a recolha. As águas são recolhidas de vários estabelecimentos, como por exemplo cafés, cantinas, restaurantes, empresas da área alimentar onde a água é utilizada para lavagem das mãos dos manipuladores ou para lavagem dos alimentos. Os procedimentos utilizados na recolha de águas têm como base normas nacionais ou europeias. A torneira por onde se vai tirar a água tem de ser desinfetada, deixa-se correr a água durante algum tempo (entre 3 a 5 minutos) e de seguida a água é recolhida numa garrafa de plástico estéril. Se a água foi tratada com cloro, deverão ser usados recipientes; além de limpos e esterilizados, com quantidade de tiosulfato de sódio que assegure uma concentração final capaz de inativar o cloro residual. A água é guardada numa arca térmica com termoacumuladores até a chegada ao laboratório. Se possível a análise é realizada no dia da recolha, caso não seja a água é colocada no frigorífico até ao dia seguinte.

As zaragatoas são feitas a manipuladores e a superfícies. Estas servem essencialmente para controlo de higienização. As zaragatoas devem ser feitas respeitando uma determinada área para poder ser feita a contabilização no fim da análise do número de microrganismo por área analisada.

#### d) Metodologia utilizada na recolha das amostras

Existem metodologias e instruções de trabalho para as diversas atividades realizadas no laboratório, ou fora do laboratório como é o caso das recolhas de amostras. Os diferentes tipos de amostras necessitam de metodologias diferentes. As metodologias têm como base documentos de referência como já foi referido anteriormente.

### III.2.2 Preparação das amostras

As amostras de água e as zaragoas não necessitam de uma diluição nem homogeneização antes da sua análise, são utilizadas diretamente para a análise a realizar. Os alimentos necessitam de um tratamento, isto é, têm de ser diluídos com determinados meios/diluentes conforme a análise a realizar, para que as placas não fiquem saturadas de UFC e que seja possível a sua leitura. A esta solução dá-se o nome de solução mãe, e diz respeito à diluição  $10^{-1}$ , em que as proporções de alimento e diluente são de 1:10. Para a maior parte das análises, exceto a contagem e pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*, a solução mãe é feita com 10 g (10 mL no caso da amostra ser líquida) do alimento e 90 g (90 mL no caso da amostra ser líquida) de Soluta de Ringer. Para isso é necessário o uso de sacos estéreis apropriados, material auxiliar (bisturi, faca, garfo, colher), suportes e balança. Coloca-se o saco estéril na balança com um suporte apropriado e abre-se o saco, tara-se a balança, adiciona-se a quantidade apropriada de amostra, com todos os cuidados de assépsia. Quando a amostra tem vários componentes deve ser pesado um pouco de cada um. De seguida adiciona-se o diluente à amostra pesada.

No caso de pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Listeria*, o meio utilizado para a preparação das soluções é o BPW (Buffered Peptone Water) sendo que se pesam 25g (25mL do alimento ser líquido) do alimento e 225g (225mL do alimento ser líquido) do meio de cultura. Na pesquisa de *Listeria* as proporções são as mesmas mas utiliza-se um meio diferente, sendo neste caso o meio de cultura ½ Fraser. No final deve-se homogeneizar a solução mãe no *Stomacher*. Os métodos a aplicar estão descritos em maior detalhe nos anexos 24 e 25.

### III.2.3 Análises microbiológicas efetuadas no laboratório YourLab Segurança Alimentar

A seguir à realização da solução-mãe é efetuada a inoculação da amostra. Para os diferentes microrganismos que se pretende analisar são usados meios de cultura adequados para esse fim, e as diluições também dependem da análise. Na maioria das análises, exceto na pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*, são feitas mais duas ou três diluições em soluto de Ringer. Para se efetuar a diluição seguinte ( $10^{-2}$ ) basta juntar 1mL da solução-mãe a um tubo com 9mL de Ringer e agitar no vórtex. Para fazer as diluições seguintes, basta repetir o procedimento, retirando sempre 1mL da diluição anterior. Conforme a análise que se efetua a adição do meio pode ser variável, no

entanto na maior parte dos casos a técnica usada é a de incorporação. Por fim, as placas inoculadas vão à estufa a temperaturas e duração adequadas à análise que se está a efetuar.

a) Contagem de Microrganismos a 30°C, 22°C e 37°C

Esta análise é normalmente aplicada nos critérios de higiene de processos. A temperatura de 30°C é normalmente indicada para análises realizadas a alimentos cozinhados ou processados, alimentos crus e zaragatoas. Esta é uma temperatura definida como ótima para o crescimento de microrganismos presentes em alimentos e superfícies, isto é considera-se que a maioria dos microrganismos que se desenvolvem nos alimentos, superfícies e manipuladores crescem maioritariamente a esta temperatura. Os métodos relativos a esta análise a alimentos e zaragatoas estão descritos em maior detalhe nos Anexos 2 e 7 respetivamente.

No caso da água fazem-se a contagem de colónias mas às temperaturas de 22°C e 37°C. No caso da água, a sua natureza físico-química implica que as temperaturas dos microrganismos que possam estar presentes tenham características diferentes dos que estão presentes nos alimentos, manipuladores e superfícies. Este procedimento está descrito no Anexo 13.

b) Contagem de Enterobactérias

As *Enterobacteriaceae*, são uma família muito numerosa, constituída por bacilos Gram negativos, aeróbio e anaeróbios facultativos, asporogénicos, imóveis ou móveis, com flagelos peritricos, fermentadores da glucose, produtores de catalase e citocromo-oxidase negativo (12). Alguns membros desta família integram a flora indígena do Homem e de outros animais, mas a sua distribuição é ubiquitária na natureza podendo também estar presente nos solos, plantas e água. Ocasionalmente estes organismos podem causar doenças nos mamíferos (12). Os principais géneros desta família são *Citrobacter*, *Edwarddsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia* e *Klebsiella*, *Morganella* e *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (12). A análise a este grupo inclui todas as bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose, sendo desnecessária a análise a coliformes fecais que incluíam apenas as bactérias fermentadoras de lactose e que tinham crescimento a 44°C (11).

Esta metodologia é usada para a análise destes microrganismos em géneros alimentícios para humanos e animais. No caso de análises a zaragatoas, a técnica é a

mesma, só não são feitas várias diluições, é usada a solução diretamente da zaragatoa como pode ser observado nos métodos descritos nos Anexos 19 para zaragatoas e 15 para os alimentos.

c) Contagem e pesquisa de Coliformes

A análise a coliforme pode-se aplicar a alimentos ou a águas, embora os métodos sejam um pouco diferentes. As análises que podem ser efetuadas a estes organismos são a pesquisa (Anexo 4) e contagem (Anexo 17).

d) Contagem de Bolores e Leveduras a 25°C

Esta análise a estes microrganismos aplica-se maioritariamente a alimentos ácidos e baixa atividade da água, atingindo normalmente frutas frescas, vegetais e cereais causando a deterioração dos mesmos. Os fungos apresentam uma preocupação não devido á sua patogenicidade mas sim devido à sua capacidade de produção de micotoxinas que podem ser muito tóxicas para o Homem. No entanto esta análise também se insere na avaliação de critérios de higiene de processos. Este método só se aplica em casos de alimentos e zaragatoas, não se aplica às análises a águas. Os procedimentos para a análise destes microrganismos estão explícitos no Anexo 3.

e) Contagem de *Enterococcus*

Os enterococos são bactérias Gram positivas que se podem apresentar em cocos isolados, aos pares ou em cadeias curtas. Ocasionalmente podem aparecer sob a forma de coco-bacilos (12). São anaeróbios facultativos e a temperatura de crescimento centra-se entre os 36-37°C. Os enterococos apresentam elevada resistência aos agentes físicos, permitindo-lhes crescer e sobreviver em ambientes hostis sendo por isso a sua presença habitual em quase todos os produtos biológicos, no solo, água, alimentos, aves e insectos (12). No organismo humano e animal, a sua presença localiza-se maioritariamente no aparelho digestivo e urinário (12). Existem algumas restrições na realização de análises a estes microrganismos como análise de indicadores, principalmente devido à sua ubiquidade e resistência, os resultados iriam indicar estes num número muito mais elevado do que os enteropatógenos encontrados no solo, vegetais e em alimentos, principalmente os alimentos que sofrerem algum processamento (11). No entanto, em alguns casos, nomeadamente na água, estes podem estar presentes por contaminação fecal. No laboratório YourLab a análise a estes



microrganismos é apenas aplicada a águas, estando a descrição dos métodos desta análise descritos no Anexo 22.

f) Contagem e Pesquisa de *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria Gram negativa que fermenta a lactose com produção de gás. Estão presentes nos intestinos auxiliando a digestão dos alimentos. A maior parte das estirpes são benéficas, no entanto algumas libertam toxinas que podem causar doenças com sintomas desde algum desconforto até à morte. Existem quatro classes de *E. coli* que podem causar doenças nos humanos tais como as enteroinvasivas, enteropatogénicas, enterotoxigénicas e a mais tóxica de todas a O157:H7 (1). As análises a este microrganismo podem ser efetuadas em alimentos, zaragatoas e águas para consumo, no entanto os métodos são diferentes. No caso dos alimentos, a análise a este microrganismo pode ser realizada no decorrer da análise de pesquisa de coliformes caso o resultado desta seja positivo (Anexo 5). Para a contagem de colónias de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva, são inoculadas três diluições da solução mãe com um meio de cultura que contém um ingrediente cromogénico (TBX) para deteção da enzima  $\beta$ -glucuronidase sendo possível contar as colónias que apresentarem cor, neste caso azul (Anexo 6). Esta técnica também se aplica a análises a este microrganismo em zaragatoas, exceto o passo das diluições. Relativamente às análises deste microrganismo nas águas, não é feito diretamente mas sim no decorrer da análise aos coliformes (Anexo 14).

g) Pesquisa de *Salmonella*

A *Salmonella* pertence ao grupo das *Enterobacteriaceae*. Este microrganismo é normalmente encontrado nos intestinos de aves e mamíferos saudáveis. Nos alimentos, é frequentemente encontrada a presença de *Salmonella* em ovos e carne crua de porcos, perus e galinhas e pode ser transmitido para os humanos pelo consumo dos alimentos contaminados (13). A legislação relativa aos critérios de segurança dos géneros alimentícios não permite a presença deste microrganismo em nenhum género alimentício, sendo por isso a pesquisa a única análise feita a este microrganismo (Anexo 9).

h) Contagem e Pesquisa de *Listeria*

A *Listeria* é um bacilo Gram positivo não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo, móvel à temperatura ambiente e

hemolítico (12). A *Listeria monocytogenes* é a única espécie do género *Listeria* causador de doença em humanos (12). É um patógeno intracelular, e devido à sua forma de ação com a imunidade celular específica dos indivíduos, logo esta a infeção desta bactéria progride com mais facilidade em pessoas com imunidade celular deficiente (12). A análise a este microrganismo é normalmente executado a alimentos, e pode ser feita ou a pesquisa ou a contagem do microrganismo, sendo os métodos para cada caso diferentes (Anexos 10 e 11).

i) Contagem de *Bacillus cereus*

Os *Bacillus*, são bacilos Gram positivos de grandes dimensões ( $1 \times 3-5 \mu\text{m}$ ), produtores de esporos quando cultivados em aerobiose (12). Existem várias espécies deste género que podem causar doenças nos humanos, como é o caso do *Bacillus cereus* que causa toxinfecções alimentares, e também existem outras espécies que podem causar infeções oportunistas (12). O *Bacillus cereus*, tem uma distribuição ubiqüitária na natureza, podendo por isso ser encontrado no solo e em plantas em crescimento. Devido a este facto, é frequente a sua aparição em alguns alimentos como carne, leite em pó, arroz e em vegetais, que quando ingeridos pelos humanos podem ser causadores de toxinfecções alimentares devido à produção de exotoxinas (12). A análise efetuada a este microrganismo está descrita no nexo 12. 34

j) Contagem *Clostridium perfringens* e Pesquisa de Esporos de clostrídios sulfito reductores

O género *Clostridium* é composto por várias espécies, e cada uma destas apresenta um conjunto de fatores de virulência distintos. Neste grupo destaca-se o grupo de Clostrídios sulfito-reductores. A análise deste grupo em alimentos ou águas para consumo humano, indica a potencial presença de *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* (14). O *Clostridium perfringens* é uma bactéria anaeróbia presente no ambiente e nos intestinos de humanos e outros animais. Devido à sua presença nestes diversos ambientes, muitos alimentos podem estar contaminados com esta bactéria, especialmente em proteína animal, nomeadamente na carne (1). Contudo são elevadas quantidades de bactérias, na ordem dos milhões, desta espécie para causar doença. As células bacterianas dividem-se a cada vinte a trinta minutos, ao fim de vinte e quatro horas uma única bactéria pode dar origem a triliões de células se o ambiente for favorável ao seu crescimento (1). A presença de pequenas quantidades destas bactérias na comida não é muito preocupante, a não ser que a comida não seja refrigerada, ou

acondicionada devidamente, ou que seja preparada muito tempo antes de ser servida. Se algum destes casos ocorrer, pode-se dar o caso de o microrganismo se desenvolver e provocar doença nos consumidores (1). A análise aos clostrídios sulfito redutores pode ser feita em amostras alimentares ou em águas para consumo. No laboratório YourLab Segurança Alimentar a análise efetuada a alimentos é aos esporos de clostrídios sulfito redutores, que são estruturas que indicam a presença do microrganismo em causa mas que ao contrário do microrganismo estes não são eliminados pelo tratamento térmico. A técnica utilizada está descrita no Anexo 8, para o caso das águas está descrito no Anexo 8.

#### h) Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos

Os *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, e são cocos Gram positivos, com diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados. São anaeróbios facultativos, elaboram catalase e produzem ácidos por degradação da glucose, em aerobiose ou em anaerobiose. De entre várias enzimas produzidas por estes microrganismos, há uma que apresenta especial atenção, que é a coagulase, uma vez que dentro das espécies patogénicas para o Homem, apenas o *Staphylococcus aureus* a produz, e como tal todas as outras espécies são designadas de coagulase-negativas ou não produtoras de coagulase (12). A análise para estes microrganismos está descrita no Anexo 16.

### III.2.4 Métodos de cálculo e expressão dos resultados

#### a) Contagem de microrganismos

Considerar as placas contendo no máximo 150 colónias, em duas diluições consecutivas. É necessário que uma das placas contenha pelo menos 15 colónias. Calcular o número N de microrganismos por mililitro ou por grama de produto, efetuando a média ponderada, com a ajuda da equação seguinte:

$$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) \times d$$

Em que:

- $\sum C$  soma das colónias contadas nas duas placas consideradas;
- $n_1$  número de placas consideradas na primeira diluição;

- n2 número de placas consideradas na segunda diluição;
- d factor de diluição correspondente à primeira diluição considerada.

#### b) Arredondamento e Expressão de Resultados

Arredondar o valor obtido a dois algarismos significativos, de acordo com a seguinte regra: para um número de 3 algarismos, se o último for inferior a 5, o algarismo precedente não se modifica; se o último algarismo for superior ou igual a 5, o algarismo precedente é aumentado de uma unidade.

Tomar como resultado, o número de microrganismos por mL ou por grama de produto, expresso por um número compreendido entre 1,0 e 9,9 multiplicado pela potência apropriada de 10.

### **III.2.3 Registo dos resultados**

No fim de todas as análises e confirmações dos microrganismos, são registados em folhas de trabalho a contagem das colónias e os resultados dos testes ou de confirmação ou bioquímicos. O laboratório dispõe de um programa (MyLAB), no qual se inserem os valores das contagens e automaticamente o programa faz as contas adequadas a cada tipo de análise.

## **III.3 Caso de estudo – Impacto da contaminação de alimentos prontos a comer Saúde Pública**

### **III.3.1 Introdução – O problema em estudo**

Esta etapa tem como objetivo, a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos através dos resultados das análises microbiológicas efetuadas em alguns estabelecimentos que produzem, confeccionam ou vendem algum tipo de alimento pronto a consumir, e verificar se é possível haver alguma relação com os dados de notificações de doenças transmitidas por alimentos.

Neste trabalho são usados dados analíticos relativos a análises microbiológicas de alimentos prontos a consumir cedidos pelo laboratório YourLab Segurança Alimentar. Os dados utilizados são referentes aos anos 2008, 2009, 2010 e 2011, o que significa que a maior parte dos dados utilizados dizem respeito a um período de tempo que não corresponde ao do estágio curricular. No entanto, foi decidido que a utilização destes dados seria mais correta uma vez que para se fazer um estudo desta natureza é

necessário o maior número de dados possível para que este tenha maior credibilidade e significância.

Para finalizar, é proposto apresentar dados cedidos pelo Ministério da Saúde, de notificações de toxinfecções alimentares tentando estabelecer uma relação entre os resultados obtidos em análises microbiológicas no laboratório da empresa e compará-los com dados de hospitais relativos a toxinfecções alimentares.

Os métodos utilizados para a amostragem, análises microbiológicas e métodos de cálculo e expressão de resultados seguem as mesmas regras do que os que foram descritos anteriormente nas atividades de estágio. No entanto, para este estudo só foram utilizadas algumas das análises microbiológicas, nomeadamente as que são utilizadas para a análise de alimentos prontos a consumir.

Para este trabalho não foi elaborado por mim um plano de amostragens, não só devido ao facto de que a maior parte das amostras terem sido feitas anteriormente ao meu estágio, mas também porque não é o laboratório que elabora o plano de amostragens mas sim as empresas que subcontratam os serviços ao laboratório. Outro motivo é que, para uma avaliação desta natureza quantos mais valores forem possíveis contabilizar mais fiável é o resultado.

A recolha e o transporte das amostras utilizadas para o estudo foram feitas pelo laboratório YourLab Segurança Alimentar, sendo estas realizadas com base em metodologias conforme as exigências das normas Europeias, e outras foram entregues no laboratório diretamente pelo cliente interessado.

### **III.3.2 Descrição dos estabelecimentos de onde provêm os alimentos para análise**

Os estabelecimentos de onde provieram as amostras são de clientes diretos do laboratório YourLab Segurança Alimentar ou de clientes de empresas que implementam sistemas de gestão de segurança alimentar e que requerem as análises microbiológicas a este laboratório. De entre estes temos vários tipos de estabelecimentos nomeadamente restaurantes, cantinas municipais, Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS's), padarias, pastelarias, queijarias e snack bares. Nos restaurantes, cantinas municipais e IPSS's são recolhidas maioritariamente refeições mistas confeccionadas no dia. Nas padarias e/ou pastelarias são recolhidos pães, pasteis e por vezes algumas refeições rápidas como são o caso de *pizzas* ou sandes, por exemplo. Nos *snack* bares

são recolhidos alguns petiscos ou refeições rápidas tais como salgadinhos, sandes, queijo e algumas vezes até sopa. Por fim nas queijarias recolhem-se queijos podendo estes serem de vários tipos distinguindo-se o amanteigado, curado, queijo fresco e requeijão.

Os alimentos considerados para este estudo foram todos os alimentos prontos a consumir analisados no laboratório YourLab Segurança Alimentar. Pode-se então fazer uma divisão destes alimentos, distinguindo-se algumas “categorias”:

- Refeições: dizem respeito a sopa ou alimentos confeccionados, normalmente compostos por peixe ou carne podendo ser o acompanhamento batata, arroz, massa ou legumes confeccionados.
- Sobremesas: Bolos sem creme, mousse de chocolate, baba de camelo, *tiramisu*, semi-frios de diversas frutas, torta e doce d’avó.
- Produtos de padarias e pastelarias: pasteis sem creme, pasteis com creme e pão.
- *Snacks* e petiscos: *Pizza*, moelas, queijos, presunto, rissóis, chamussas, bolos de bacalhau, sandes mistas, bifanas, tremoços, salada de orelha.
- Queijos: amanteigado, curado, queijo fresco e requeijão.
- Charcutaria: Chouriço, paio, presunto, fiambre, mortadela.

### III.3.4 Análises microbiológicas consideradas para o estudo

As análises efetuadas não foram planificadas para este caso de estudo. As empresas é que pedem as análises conforme a necessidade dos seus clientes. As análises efetuadas seguem as metodologias anteriormente descritas neste trabalho (da página 41 à 45). Neste estudo, só foram consideradas algumas das análises realizadas no laboratório, devido ao documento em que foi baseada a classificação da qualidade microbiológica dos alimentos como vai ser possível averiguar mais à frente. Os microrganismos analisados considerados para este estudo foram:

**Tabela 5 – Análises microbiológicas efetuadas aos alimentos prontos a consumir consideradas para o estudo.**

Lista de análises microbiológicas consideradas para o estudo	
Microrganismos 30°C	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>
Coliformes totais	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Esporos de Clostrídios sulfito redutores	<i>Listeria monocytogenes</i>

### **III.3.6 Interpretação dos dados relativos às análises microbiológicas efetuadas no Laboratório YourLab Segurança Alimentar desde 2008 a 2011**

Os dados cedidos pelo laboratório YourLab Segurança Alimentar foram alvo de uma seriação para se obter apenas uma seleção de resultados de análises microbiológicas efetuadas a alimentos prontos a consumir. A partir de todos os dados, que dizem respeito a todos os tipos de amostras analisadas, como são o caso de zaragatoas, águas e alguns alimentos que não têm interesse para o estudo em questão, foram filtrados apenas os dados desejados, ou seja, dados relativos às análises aos alimentos prontos a consumir. Para que fosse possível fazer a avaliação da qualidade microbiológica, foi necessário enquadrar o tipo de alimentos considerados, conforme o documento usado como referência. O documento em causa foi publicado pelos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Lisboa e Porto). Este documento apresenta duas tabelas complementares. A primeira diz respeito às características da amostra em causa e distingue 3 Grupos que variam consoante tipo de ingredientes que entram na composição da amostra em causa, o tratamento térmico ou outro tratamento que lhe seja aplicado. Na Tabela 6 pode-se analisar com maior pormenor a distinção e alguns exemplos destes Grupos.

**Tabela 6 - Grupo de alimentos prontos a consumir (17).**

Grupo	Produto	Exemplos
1	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada.	Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Salada de batata com maionese industrial Pastéis de bacalhau/croquetes/rissóis Sandes de carne assada Sandes de paté de atum (maionese industrial) Omeleta de queijo/fiambre Mousse de chocolate instantânea Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/fruta laminada em calda
2	Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão frade com atum, salsa e cebola picada ou molho de vinagre Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás c/ salsa e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos Mousse de Chocolate Pudins com fruta ao natural Salada de fruta em calda adicionada de fruta ao natural
3	Saladas/Vegetais/Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos

Após a atribuição de um Grupo aos alimentos estudados foi então atribuída a avaliação da qualidade microbiológica relativamente aos resultados analíticos das análises microbiológicas efetuadas aos alimentos. Os valores guia para a avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos cozinhados prontos a consumir foram suportados pela Tabela 7.



**Tabela 7 - Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir (17).**

Microrganismos	Grupo de Alimentos	Qualidade microbiológica (UFC/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável/potencialmente perigoso
Microrganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Leveduras	1* e 2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
Bolores	1* e 2	$\leq 10$	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	#
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$>10^3$	#
Coliformes totais	1	$\leq 10$	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
	2	$\leq 10$	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>E. coli</i>	1,2	$>10$	NA	$\geq 10$	NA
	3	$\leq 10$	$>10 \leq 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria</i> spp.	1,2 e 3	$>10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Anaeróbios sulfito redutores	1,2 e 3	$\leq 10$	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ #
Patogénios					
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1,2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1,2 e 3	$\geq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1,2 e 3	$< 10$	$10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella</i> spp.	1,2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,2 e 3	Ausente em 25g	Presente em 25g $< 10^2$ #	-	$\geq 10^2$
<i>Campylobacter</i> spp.	1,2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1,2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
* - Aplicável em produtos conservados no frigorífico					
#- Equacionado caso a caso					
NA – Não aplicável					

Os resultados analíticos consoante a sua classificação indicam a qualidade microbiológica dos alimentos, sendo que “Satisfatório” indica uma boa qualidade microbiológica, “Aceitável” indica que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos, “Não satisfatório” indica que produto não satisfaz um ou mais dos

valores estabelecidos e “Inaceitável/potencialmente perigoso” indicam a presença de microrganismos patogênicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde. Quando o resultado da qualidade microbiológica é “Inaceitável/potencialmente perigoso” deve-se comunicar imediatamente à unidade onde foi detectado para que sejam tomadas medidas que possibilitem a correção da situação.

Estas tabelas foram elaboradas como resposta à necessidade da existência de valores de referência para avaliação dos resultados obtidos das análises microbiológicas aos alimentos prontos a consumir efetuadas no âmbito de diversos estudos que têm vindo a ser desenvolvidos há mais de 30 anos e que até então não tinham valores guia para uma avaliação dos resultados obtidos. A elaboração deste documento só foi possível devido á vasta experiência que possuem, principalmente devido ao número de amostras analisadas que são cerca de 4000 por ano. Reunindo a experiência e vários documentos internacionais publicados foi possível construir os valores guia para a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir (18).

### III.3.7 Resultados e Discussão

#### a) Avaliação da qualidade microbiológica da globalidade dos dados analisados

Na Figura 3 é representada a qualidade microbiológica de todas as amostras, relativamente a alimentos prontos a consumir, analisadas desde o ano 2008 ao ano 2011 no laboratório YourLab Segurança Alimentar.

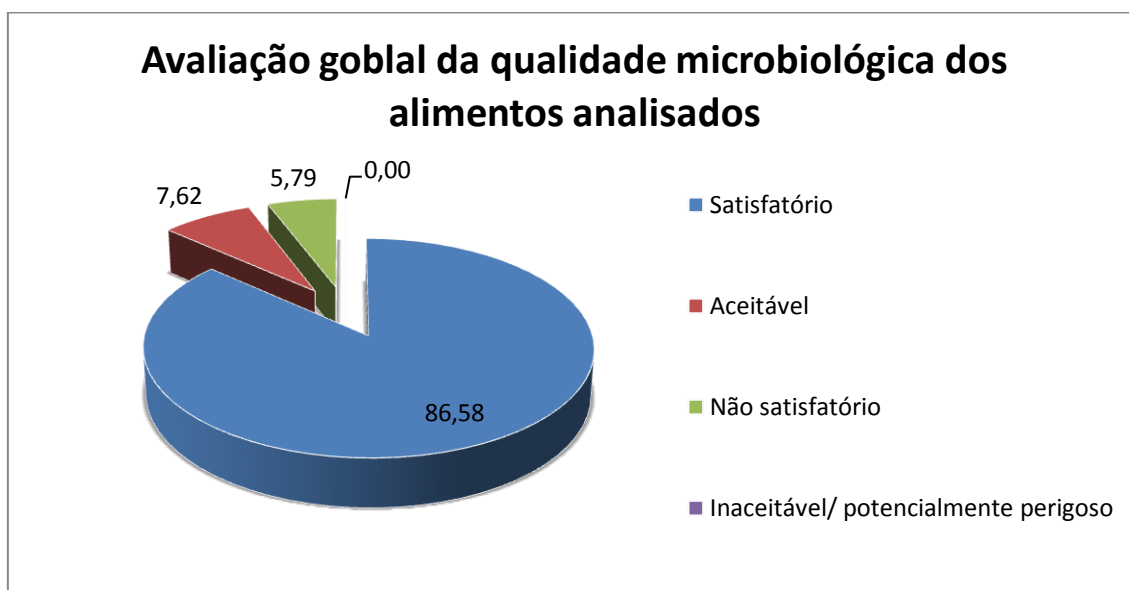


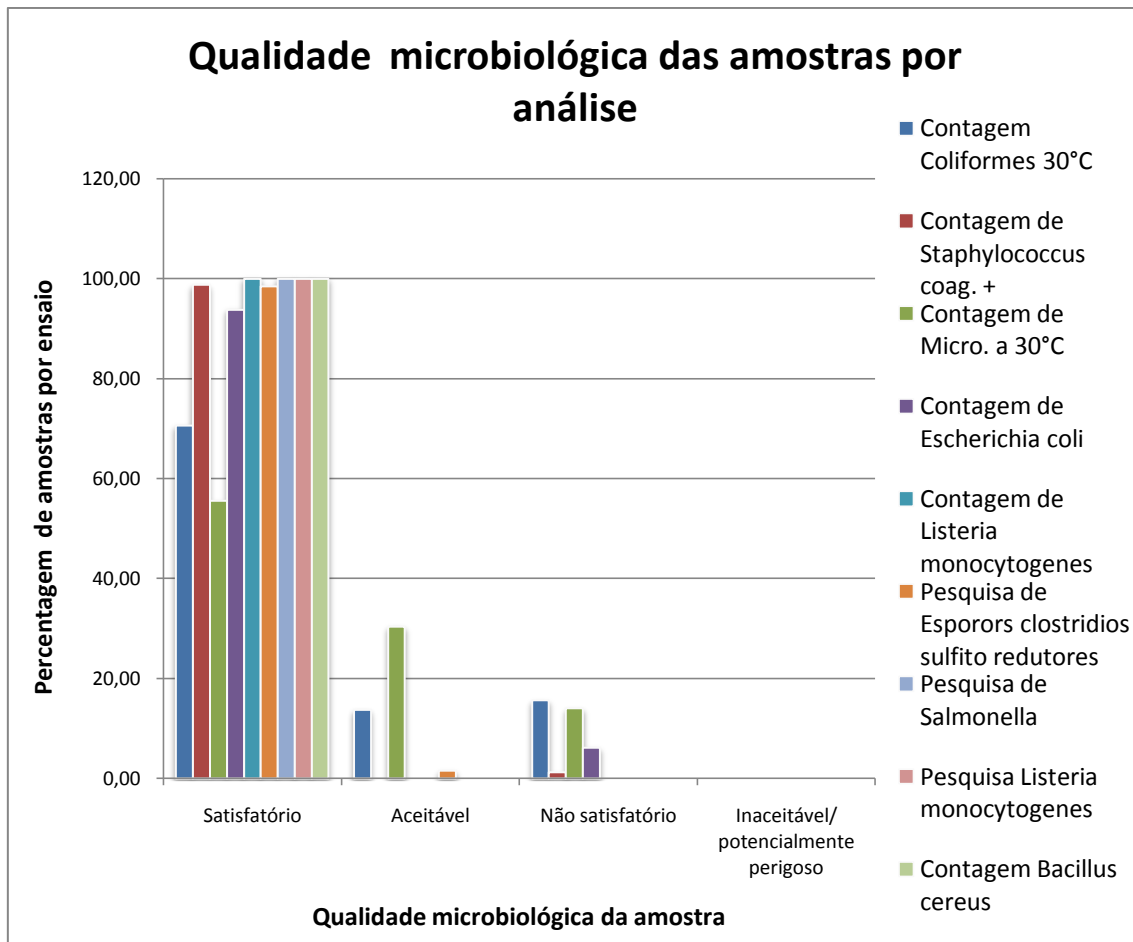
Figura 3 - Avaliação global da qualidade microbiológica dos alimentos analisados.

Os resultados obtidos são apresentados pela classificação de “Satisfatório”, “Aceitável”, “Não Satisfatório” e “Inaceitável/Potencialmente Perigoso”.

Pela análise da Figura 3 verifica-se que a maioria dos resultados analíticos das análises microbiológicas indicam boa qualidade microbiológica, apresentado 86,58% (2078/2400) dos casos “Satisfatório”. A restante parte divide-se que forma análoga em que 7,63% (183/2400) qualifica-se como “Aceitável” e os restantes 5,79% (139/2400) é “Não Satisfatório”. Verifica-se que não existe nenhum caso “Inaceitável/potencialmente perigoso”. Estes resultados indicam que estão a ser cumpridas as Boas Práticas de fabrico e higiene não sendo necessário tomar novas medidas de prevenção ou de controlo. Na elaboração deste gráfico foram consideradas todas as classificações dos resultados para os tipos de análises efetuadas.

#### **b) Avaliação da qualidade microbiológica das amostras analisadas por tipo de análise efetuada**

Na Figura 4 estão apresentadas todas as análises que foram consideradas para o estudo e é avaliada a qualidade microbiológica dos alimentos para cada análise realizada.



**Figura 4 - Qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir por tipo de análise.**

Antes de ser atribuída a classificação relativamente à qualidade do alimento é necessário a integração do tipo de alimento num Grupo. Para cada análise existem limites diferentes, sendo os limites também diferentes para cada Grupo de alimentos.

Para a avaliação dos dados estudados para este trabalho não foram tidos em conta todos os parâmetros apresentados na tabela dos valores guia uma vez que são as empresas que requerem o serviço que definem que análises é que devem ser feitas para cada estabelecimento tendo em conta o alimento produzido. Nos dados considerados para o estudo não houve nenhum caso de análise a *Campylobacter* spp., *Vibrio parahaemolyticus* e *Yersinia enterocolitica*. Segundo os relatórios anuais da EFSA casos de *Campylobacter* spp. são os que apresentam maior número de notificações e têm vindo a aumentar ao longo dos últimos anos. Em Portugal ainda não houve registo de surtos ou de casos deste microrganismo, no entanto tem vindo a aumentar na EU o que pode ser um sinal que terá de se dar mais importância a este microrganismo principalmente devido às importações de géneros alimentícios da Europa.

As análises a bolores e leveduras também não foram consideradas para o estudo uma vez que no laboratório YourLab Segurança Alimentar a análise é feita em conjunto. Uma vez que valores guia dos limites para estes microrganismos é em separado, não seria correto estar a assumir valores sem base científica fundamentada.

No laboratório também não são efetuadas análises a *Clostridium perfringens* a alimentos, apenas a águas por isso para este estudo também não foi tido em conta.

Na Figura 4 pode-se observar que quatro do tipo de análises efetuadas apresentam como qualidade microbiológica 100% Satisfatório. Este resultado indica muito boa qualidade dos alimentos uma vez que se tratam de três dos microrganismos patogénicos, nomeadamente a *Salmonella* spp. (pesquisa), *Listeria monocytogenes* (pesquisa e contagem) e *Bacillus cereus* (contagem).

O segundo tipo de análise a apresentar melhor resultado diz respeito a outro microrganismo patogénico, o *Staphylococcus coagulase positiva* em que apresenta 98,76% dos valores Satisfatórios. Para a análise a este microrganismo não existem limites para o aceitável, isto é se os valores obtidos ultrapassarem o limite para a avaliação de Satisfatório o valor é considerado Não Satisfatório ou Inaceitável/Potencialmente perigoso caso os valores ultrapassem o limite do Não Satisfatório. Os resultados Não Satisfatórios dizem respeito a 5 das 403 análises deste tipo que foram efetuadas, sendo que um dos casos não satisfatórios foi a uma refeição e os outros 4 foram a pastéis.

De seguida aparece a análise a pesquisa de esporos sulfito redutores comum valor aproximado do anterior apresentado, 98,42%. Estas estruturas são mais resistentes do que os microrganismos que lhes dão origem e por si só também a presença de anaeróbio sulfito redutores no alimento. Em 294 apenas 4 estavam com avaliação Aceitável e dizem respeito a uma sopa, uma sobremesa e 2 pastéis.

Os outros três microrganismos analisados dizem respeito aos microrganismos designados como indicadores da qualidade do alimento, sendo que os patológicos dizem respeito à segurança. De entre estas três o que apresenta mais valores Não Satisfatórios e a análise a Coliformes a 30°C (15,65%), seguido da análise a Microrganismos a 30°C (14,04%) e *E. coli* (6,19%). Os restantes valores encontram-se com qualidade Aceitável e Satisfatório.

### c) Comparação da qualidade microbiológica entre diferentes tipos de estabelecimentos

Para fazer uma análise se existe diferença na qualidade microbiológica de alimentos prontos a consumir em estabelecimentos de diferente tipo, foram selecionados quatro casos aleatoriamente. Foi selecionada uma cantina, um restaurante, uma padaria, e uma IPSS (Lar/infantário). Na Figura 5 é possível verificar que não existe diferenças significativas da qualidade microbiológica dos alimentos em diferentes tipos de estabelecimentos.

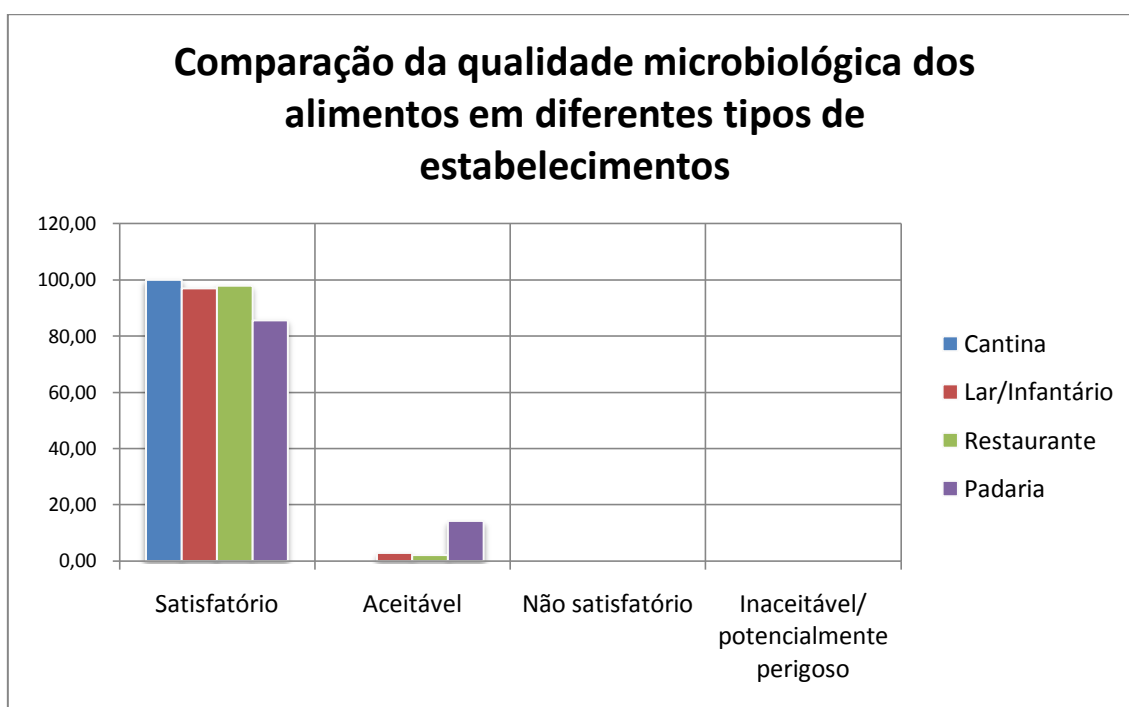


Figura 5 - Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos de diferentes tipos de estabelecimentos.

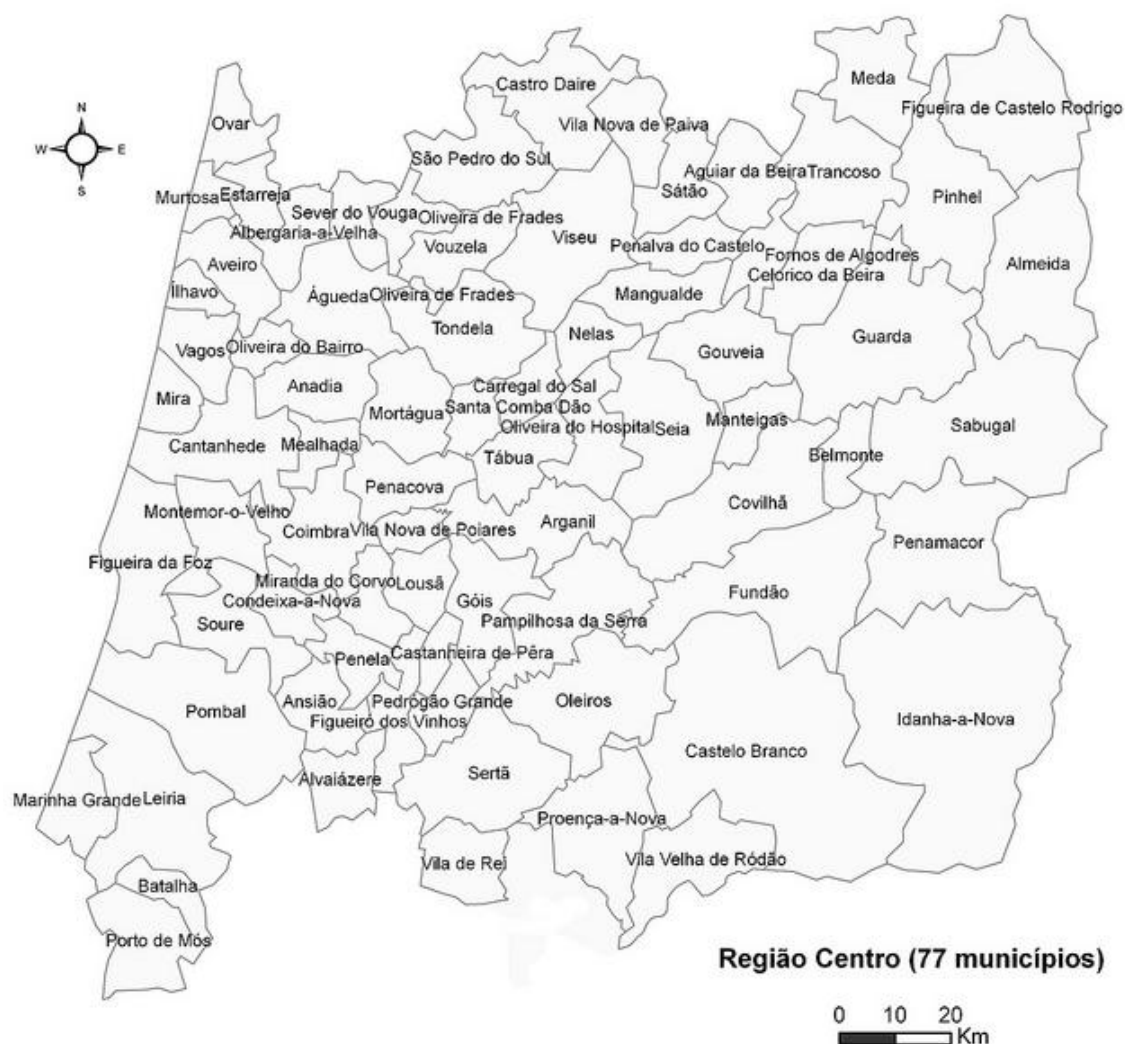
Para além disso em nenhum destes casos, selecionados ao acaso para comparação, existem alimentos com qualidade Não Satisfatória ou Inaceitável/potencialmente perigoso. Estes dados, apesar de não serem representativos de um todo, podem sugerir que estão a ser cumpridas as boas práticas de fabrico e de higiene, resultando em alimentos seguros para os consumidores.

Os casos que foram compreendidos para este estudo tratam-se de pequenos estabelecimentos. A implementação do sistema HACCP neste tipo de estabelecimentos muitas vezes não é encarado como deveria ser, como por exemplo uma mais valia para a qualidade dos alimentos que são vendidos ou para uma maior credibilidade por parte

dos consumidores que frequentam o estabelecimento. Neste tipo de estabelecimentos pequenos a implementação do sistema HACCP é considerado mais uma forma de ganhar dinheiro pelas empresas que o implementam, e como tal as análises que são efetuadas são as mínimas possíveis, não se pode dizer obrigatórias pois não existe legislação nacional que obrigue os alimentos prontos a consumir a fazê-lo, mas as mínimas para que seja considerado que estão a ser controladas as etapas do processo de preparação do alimento.

#### **III.4 Comparação da avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos com dados de toxinfecções alimentares**

Neste ponto o objetivo que se pretendia cumprir era comparar a qualidade microbiológica dos alimentos analisados, que foi apresentado nos pontos anteriores, com dados de toxinfecções alimentares, nomeadamente toxinfecções alimentares coletivas (surtos). Os alimentos analisados provieram de estabelecimentos situados na Região Centro do país (Figura 6), e como tal é pertinente comparar apenas com os valores de toxinfecções alimentares coletivas desta mesma região.



**Figura 6 – Mapa da Região Centro de Portugal por municípios (19).**

A informação em causa não está publicada pelo menos para acesso ao público em geral e como tal, foi necessário pedir informação à Administração Regional de Saúde do Centro (ARSC). Quando esta entidade foi solicitada para disponibilizar esta informação, não só verificou que para o intervalo de tempo pretendido não existiam alertas de TAC, como também não era possível fazer a comparação idealizada para o trabalho. Foi explicado pelos profissionais da área, que o estudo relativamente à comparação da qualidade microbiológica dos alimentos analisados no laboratório YourLab Segurança Alimentar e as TAC não é possível, pois não é cientificamente comparável. Só se podem comparar análises efetuadas a alimentos com análises efetuadas a amostras humanas de pessoas que tenham consumido esses mesmos produtos alimentares. Como tal, não só não é possível fazer a comparação, como também não é possível apresentar os dados das TAC relativamente ao intervalo de



tempo pretendido uma vez que a partir do ano 2007 (inclusive), os dados de alertas de TAC são muito poucos quase inexistentes. Não existe nenhuma explicação científica para este facto. Contudo, podem-se analisar alguns dados relativamente a Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) de origem alimentar.

### **III.5 Avaliação dos casos de DDO de origem alimentar na Região Centro referente aos anos de 2009 até 30 de Maio de 2012**

As DDO são doenças infecciosas potencialmente epidémicas que podem causar graves prejuízos à saúde das populações. Em todos os países desenvolvidos existe obrigação legal da sua declaração, por parte dos médicos que as diagnosticam, quer pertençam ao sector público quer pertençam ao sector privado (20). Em Portugal, desde 9 de Agosto de 1949, está implementado o Sistema de Vigilância das DDO por força da lei que lhe dá corpo e que estabelece a primeira lista oficial destas doenças (20). A declaração obrigatória tem como objetivo congrega a informação necessária em tempo oportuno para que seja possível executar as medidas de controlo e prevenção adequadas, sendo estas da responsabilidade da autoridade de saúde (20). A lista atual destas doenças, constituída por 45 entidades nosológicas, foi atualizada em 2005.

Tendo em conta os objetivos deste trabalho, foram excluídas as DDO de origem não alimentar. Assim, foram consideradas a “Brucelose de Origem Alimentar”; as “Febres Tifóide e Paratifoide” e as “Outras Salmoneloses” que representam 10% (125/1254) do total de doenças declaradas na região de 1 de Janeiro de 2009 a 30 de Maio de 2012. Existem outras fontes de dados que seria possível consultar, como o Sistema de Alerta e Resposta Apropriada da Direção Geral da Saúde (SARA); os alertas por Toxinfecções Alimentares Coletivas (TAC) por força da circular normativa N.º14/DT de 9/10/2001 da DGS; os Grupos de Diagnósticos Homogéneos (GDH) dos hospitais, porém, o tempo necessário para pesquisar todas as fontes possíveis não é compatível com o calendário do presente trabalho.

Na Tabela 8 é possível observar o número de notificações das três entidades nosológicas acima referidas declaradas neste intervalo de tempo, bem como as admissões hospitalares, sendo ainda possível classificar as notificações por Casos Isolados (CI) (ou esporádicos) e por Casos Agrupados (CA) ou “clusters”. Sempre que a investigação epidemiológica identifica CA no tempo e no espaço sem que seja

possível comparar o número de casos observados com o número de casos esperados, estes classificam-se como CA; de contrário classificam-se como Surtos ou Epidemias.

**Tabela 8 – Doenças de Declaração Obrigatória de Origem Alimentar declaradas na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de Maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Ano	Nº de Casos				Nº de admissões Hospitalares
	Isolados	Total	Agrupados	Nº de casos	
2009	39	39	0	0	27
2010	29	29	0	0	18
2011	18	51	3	33	25
2012*	6	6	0	0	2
Total	92	125	3	33	72

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

Pode-se verificar que o número de casos total (125) é muito próximo do número de casos isolados (92) e mais de metade dos casos notificados foram hospitalizados (72). Relativamente aos CA, estes dizem respeito a notificações que apresentam o mesmo critério clínico e epidemiológico bem como relação epidemiológica de tempo e espaço. Nesta série temporal apenas são verificados 3 CA no ano de 2011 que, no conjunto, implicaram 33 casos.

As definições epidemiológicas de caso para a notificação de doenças transmissíveis à rede comunitária constam da Decisão da Comissão Europeia de 28 de Abril de 2008, publicada no Jornal oficial da União Europeia de 18 de Junho de 2008. Os casos podem ser classificados como “possíveis”, “prováveis” e “confirmados”, segundo critérios clínicos, laboratoriais ou epidemiológicos, conforme a doença. Para a definição dos casos tem de se obedecer a determinados critérios, clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, que são descritos na decisão acima referida. A definição dos casos dá-se por:

“Caso possível: Corresponde a um caso que é classificado como possível para efeitos de notificação. Geralmente preenche os critérios clínicos descritos na definição do caso, sem que, no entanto, haja provas epidemiológicas ou laboratoriais da doença em causa. A definição de caso possível é muito sensível e pouco específica. Embora permita a deteção da maioria dos casos, esta categoria irá incluir alguns falsos positivos.” (21)

“Caso provável: Corresponde a um caso que é classificado como provável para efeitos de notificação. Geralmente preenche critérios clínicos e apresenta uma relação

epidemiológica tal como descrito na definição correspondente. Neste âmbito, só se indicam análises laboratoriais para algumas doenças.” (21)

“Caso confirmado: Corresponde a um caso que é classificado como confirmado para efeitos de notificação. Os casos confirmados devem ser confirmados laboratorialmente e podem cumprir os critérios clínicos ou não tal como descrito na definição do caso. A definição de um caso confirmado é muito específica e menos sensível; por conseguinte, a maioria dos casos detetados corresponde a casos genuínos, embora alguns possam não ser despistados.” (21)

Estas definições ajudam a entender as tabelas seguintes em que vão ser apresentados os dados das DDO de origem alimentar e por ano, sendo especificados os casos prováveis, suspeitos (possíveis), e confirmados. De seguida pode-se analisar os dados acima referidos relativamente à brucelose, febres tifoide e paratifoide e outras salmoneloses nas tabelas 9, 10 e 11 respetivamente.

**Tabela 9 - Casos de brucelose de origem alimentar, declaradas na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Ano	Nº de Casos							Nº de admissões hospitalares
	Prováveis	Suspeitos	Confirmados	Isolados	Total	Agrupados	Nº de casos	
2009	0	0	3	3	3	0	0	2
2010	2	1	2	5	5	0	0	2
2011	1	1	29	2	31	1	29	7
2012*	0	0	2	2	2	0	0	0
Total	3	2	36	12	41	1	29	11

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

Os casos notificados desta doença ao longo do tempo estudado, representam 32,8% (41/125) da totalidade das notificações doenças consideradas, enquanto o número de hospitalizações apresenta 15,28% (11/72) da totalidade dos casos notificados. O ano em que houve maior notificação de casos de brucelose de origem alimentar foi em 2011. Este ano coincide com um “caso agrupado” que envolveu 29 casos.

**Tabela 10 - Casos de febres tifoide e paratifoide de origem alimentar, declaradas na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Ano	Nº de Casos							Nº de admissões hospitalares
	Prováveis	Suspeitos	Confirmados	Isolados	Total	Agrupados	Nº de casos	
2009	1	0	11	12	12	0	0	5
2010	1	0	6	7	7	0	0	5
2011	0	0	1	1	1	0	0	0
2012*	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	2	0	18	20	20	0	0	10

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

Os casos notificados desta doença ao longo do tempo estudado, representam 16,0% (20/125) da totalidade das notificações doenças consideradas, enquanto o número de hospitalizações apresenta 13,89% (10/72) da totalidade dos casos notificados. Para esta doença não se verifica nenhum caso isolado. Pode-se também verificar que ao longo dos anos a tendência da notificação destas doenças tem diminuído.

**Tabela 11 - Casos de outras salmoneloses de origem alimentar, declaradas na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Ano	Nº de Casos							Nº de admissões hospitalares
	Prováveis	Suspeitos	Confirmados	Isolados	Total	Agrupados	Nº de casos	
2009	0	0	24	24	24	0	0	20
2010	0	0	17	17	17	0	0	11
2011	0	0	19	15	19	2	4	18
2012*	0	0	4	4	4	0	0	2
Total	0	0	64	60	64	2	4	51

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

Os casos notificados desta doença ao longo do tempo estudado, representam 51,2% (64/125) da totalidade das notificações das doenças consideradas, sendo responsável por metade da totalidade de casos. Quanto ao número de hospitalizações apresenta 70,83% (51/72) da totalidade dos casos notificados.

Nas tabelas 12, 13 e 14 referentes aos alimentos apontados como suspeitos nas notificações das doenças.

**Tabela 12 - Brucelose de Origem Alimentar, por frequência de consumo de alimentos suspeitos, declarada na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Alimentos suspeitos	Ano					Proporção de alimentos suspeitos (%)
	2009	2010	2011	2012*	Total	
Queijo	2	1	29	2	34	82,93
Indefinido	1	3	2	0	6	14,63
Leite	0	1	0	0	1	2,44
Total	3	5	31	2	41	100,00

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

O alimento considerado suspeito para a brucelose de origem alimentar com maior frequência foi o queijo que contribuiu com 82,93% (34/41) da totalidade dos alimentos suspeitos.

**Tabela 13 - Febres Tifoide e Paratifoide, por frequência de consumo de alimentos suspeitos, declaradas na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Alimentos suspeitos	Ano					Proporção de alimentos suspeitos (%)
	2009	2010	2011	2012*	Total	
Indefinido	8	3	1	0	12	60,00
Água de consumo humano	3	4	0	0	7	35,00
Marisco	1	0	0	0	1	5,00
Total	12	7	1	0	20	100,00

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

No caso das febres tifoide e paratifoide foram considerados suspeitos vários alimentos não recaindo a suspeita em nenhum em particular, mas remetendo para refeições. Os alimentos indefinidos apresentam mais de metade, 60,0% (12/20) das suspeitas de exposição relacionada com esta doença.

**Tabela 14 - Outras Salmoneloses, por frequência de consumo de alimentos suspeitos, declaradas na Região Centro de 1 de janeiro de 2009 a 30 de maio de 2012. Fonte: Sistema Nacional de Vigilância das Doenças de Declaração Obrigatória, Administração Regional de Saúde do Centro, Maio 2012**

Alimentos suspeitos	Ano					Proporção de alimentos suspeitos (%)
	2009	2010	2011	2012*	Total	
Indefinido	14	14	11	1	40	62,50
Ovos	5	2	3	0	10	15,63
Água de consumo humano	1	1	0	1	3	4,69
Leite	1	0	0	1	2	3,13
Caracóis	2	0	0	0	2	3,13
Marisco	0	0	2	0	2	3,13
Mousse de chocolate	0	0	2	0	2	3,13
Bolo de pastelaria	1	0	0	0	1	1,56
Pataniscas de bacalhau	0	0	1	0	1	1,56
Churros	0	0	0	1	1	1,56
Total	24	17	19	4	64	100,00

\* Registos de 1 de janeiro de 2012 a 30 de maio de 2012

As outras salmoneloses de origem alimentar, tal como as febres tifóide e paratifoide, apresentavam os alimentos indefinidos como alimentos suspeitos de relação causal com maior frequência 65,50% (40/64). Seguem-se os ovos com 15,63% (10/64) das suspeitas e a todos os outros alimentos couberam proporções inferiores a 5%.

Os valores elevados de incriminação de alimentos indefinidos podem apontar para uma investigação epidemiológica deficiente. No entanto, para que seja efetuada a investigação, as autoridades de saúde devem ser alertadas em tempo oportuno.

Ao contrário das TAC, entidade nosológica que representa um conjunto agregado de casos, cada notificação de DDO representa um único caso. Como nas DDO, também nas TAC, a declaração é obrigatória por força dos diplomas legais já referidos. Com base nos dados analisados, verifica-se que foram declarados alguns casos agrupados, para os quais não existem as correspondentes DDO. Esta subnotificação pode explicar-se, em parte, à falta de sensibilidade de os clínicos notificarem doenças que consideram de carácter benigno.

A falta de dados, ou os dados incompletos que existem, uma vez que na maior parte dos casos, quando há inquéritos epidemiológicos estes estão incompletos, permite pensar que o sistema de vigilância das DDO necessita de ser melhorado.

Com a análise dos dados apresentados e com base em bibliografia existente de outros autores que também estudam esta área, ainda existe um caminho longo a percorrer para a otimização dos sistemas de vigilância das doenças de origem alimentar. A informação deve ser remetida para entidades específicas, e não encontrar-se dispersa como é o caso atual. Também deverá ter de se fazer apelos de sensibilização para que os valores de notificações sejam cada vez mais próximas da realidade, não devendo abranger apenas as autoridades de saúde mas também o público em geral, porque muitas vezes os casos de toxinfecções alimentares não chegam aos hospitais.

### **III.5 Conclusão**

Os objetivos propostos que envolvem diretamente as atividades desenvolvidas no laboratório YourLab Segurança Alimentar, como são o caso do acompanhamento do processo de acreditação e implementação da NP EN ISSO/IEC 17025 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração” e a participação nas recolhas e análise microbiológica de amostras e todo o resto do trabalho associado, foram atingidos. Relativamente aos objetivos associados ao caso de estudo, não foi possível atingir todos os objetivos que se pretendiam. Quanto á avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos prontos a consumir analisados, pode-se concluir que qualidade microbiológica dos alimentos analisados no laboratório YourLab Segurança Alimentar, é boa, uma vez que cerca de 86% dos resultados das análises obtêm valores que indicam a qualidade de “Satisfatório”. Este resultado pode ser indicador de que estão a ser tomadas as medidas corretas de higiene e manipulação dos alimentos, bem como a sua confeção e acondicionamento, nos estabelecimento da área alimentar em causa.

Não foi possível fazer a comparação entre qualidade microbiológica dos alimentos analisados no laboratório com os dados de notificação de casos de TAC. Para que fosse possível fazer a análise comparativa pretendida, era necessário que as análises efetuadas fossem a alimentos que fossem suspeitos ter provocado doença, ou seja, este estudo só seria possível de ser executado no decorrer de uma investigação epidemiológica desencadeada por um alerta por parte das autoridades de saúde. No entanto, apesar de com base na bibliografia, se verificar subnotificação das doenças de origem alimentar, penso que foi interessante observar os dados relativos às notificações das DDO de origem alimentar. Verifica-se pela análise dos inquéritos das DDO que ainda existe um défice na eficácia da investigação epidemiológica. Porém, o que ainda

piora a situação dos inquéritos é o atraso pelas autoridades de saúde a dar a conhecer em tempo útil aos delegados de saúde, os casos de DDO para que possam ser tomadas as medidas apropriadas em tempo oportuno. Pode-se concluir também que o alerta das TAC não está a ser devidamente realizado, uma vez que no decorrer da recolha de informação das DDO, foram encontrados alguns casos agrupados que deveriam ter sido investigados como TAC, pelo menos o de maior dimensão que atingiu 29 pessoas.

## **Bibliografia**

1. **Roberts, Cynthia A.** *The food safety information handbook*. Westport : Greenwood Publishing Group, Inc., 2001.
2. **Baptista, Paulo e Venâncio, Armando.** *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos*. Guimarães : Forvisão - Consultadoria em formação integrada, lda., 2003.
3. **ASAE.** *Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal*. Lisboa : Ministério da Economia e Inovação, 2009.
4. **European Food safety Authority - European Centre for Disease Prevention and Control.** *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses*, s.l. : EFSA Journal, 2012. 10(3):2597.
5. **European Food Safety Authority - European Center for Disease Prevention and Control.** *The European Union Summary report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009*. s.l. : European Food Safety Authority, 2011.
6. **Direção-Geral da Saúde.** Circular Normativa nº 14/DT. *Vigilância e Controlo das Toxinfecções alimentares coletivas*. Lisboa : s.n., 2001.
7. **Baptista, Paulo e Antunes, Christine.** *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração - Volume II -Avançado*. Guimarães : Forvisão - Consultoria em Formação Integrada, S.A., 2005.
8. **Morgado, Ana Sofia João.** *Validação de limites críticos do plano HACCP e avaliação de risco microbiológico num estabelecimento de restauração*. Lisboa : Universidade de Lisboa - Faculdade de Farmácia, 2007.
11. *Noções gerais de Higiene e Segurança Alimentar - Boas Práticas e Pré-requisitos HACCP*. **Novais, Maria do Rosário.** Segurança e Qualidade Alimentar, Lisboa : INSA, 2006, Vols. Newsletter 1, Novembro.
12. **Bolton, Declan J. e Maunsell, Bláithín.** *Guia para Controlo da segurança Alimentar em Restaurantes Europeus*. Dublin : s.n.
13. **Schmidt, Ronald H. e Rodrick, E. Gary.** *Food Safety Handbook*. Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2003.



15. **Pelczar, Michael J., et al.** *Microbiologia ; Conceitos e Aplicações*, Volume I, 2ª Edição. São Paulo : MAKRON Books, 1996.
16. **Forsythe, S. J. and Hayes, P. R.** *Food Hygiene, microbiology and HACCP, Third Edition*. Gaithersburg, Maryland : Aspen Publishers, Inc., 1998.
17. **IPAC - Instituto Português de Acreditação.** *Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*. Caparica : s.n., 2010.
18. *Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração.* **Santos, M. Isabel, et al.** Perspectivas, 2005, Vol. ROF 68. INSA.
20. **Ministério da Saúde, Administração Regional de Saúde do Centro.** *Plano de Ação 2009*. Coimbra : s.n., 2009.
21. *Decisão da Comissão Europeia de 28 de Abril de 2008 que altera a Decisão 2002/253/CE que estabelece definições de casos para notificação de doenças transmissíveis à rede comunitária ao abrigo da Decisão nº 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.* **Europeias, Comissão das Comunidades.** Decisão da Comissão, s.l. : Jornal oficial da União Europeia, 2008.

#### **Portais da Internet:**

9. [http://europa.eu/legislation\\_summaries/index\\_pt.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/index_pt.htm). [Online] [Citação: 25 de Janeiro de 2012.]  
[http://europa.eu/legislation\\_summaries/food\\_safety/veterinary\\_checks\\_and\\_food\\_hygiene/f84001\\_pt.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/veterinary_checks_and_food_hygiene/f84001_pt.htm).
10. European Food Safety Authority. [Online] 1 7, 2012.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>.
14. <http://www.fao.org/>. [Online] [Citação: 25 de Janeiro de 2012.]  
<http://www.fao.org/docrep/v9723t/v9723t0e.htm>.
19. Galeria de CCDD - Centro / Região Centro de Portugal/ flickr do Yahoo. *Yahoo! UK Ltd.* [Online] [Citação: 29 de Maio de 2012.]  
<http://www.flickr.com/photos/ccddrc/5411008520/>.

## **ANEXOS**

## Anexo 1 - Tabela das instruções de trabalho, metodologias e procedimentos e os respectivos documentos de referência.

Instruções de Trabalho e Metodologias		Documentos de Referência
	Controlo Ambiental	ISO 7218:2007 -Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
	Verificação de balança	ISO 7218:2007 -Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
	Utilização de Câmara de Fluxo Laminar	ISO 7218:2007 -Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
	Teste de CAMP	ISO 11290 – 1/2Método horizontal para a deteção e enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>
	Higienização de equipamentos e superfícies	ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
	Armazenamento e preparação de meios	ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations ISO 1113:2000 - Guidelines on preparation and production of culture media Part 1: General Guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in laboratory. Análise Microbiológica de alimentos e água - Guia para a garantia da qualidade-Edição 2003
	Controlo da Qualidade	ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations Análise Microbiológica de alimentos e água - Guia para a garantia da qualidade-Edição 2003
	Utilização culturas de referência	ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations Guia Relacre 6 - Acreditação Laboratórios de Ensaaios Microbiológicos
	Leitura de Cloro em amostras de água	Livro de instruções do equipamento
Metodologias	Executar Ensaios	NP EN ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração
	Colheita da Amostra para Análises Microbiológicas	NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas
	Preparação da Amostra para Análises Microbiológicas	NP 1829: 1982 - Preparação da amostra para análise microbiológica NP 1828: 1982 - Colheita de amostras para análise microbiológica NP 2079: 1989 - Regras gerais para análise microbiológica
	Preparação solução mãe e diluições	ISO 6887-1: 1999 - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part1 - General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilutions
	Regras gerais para contagem de Bolores e Leveduras a 25°C Parte 1: Método corrente	prNP 3277-1:2002 - Regras gerais para contagem de Bolores e Leveduras a 25°C Parte 1: Método corrente ISO 6887-1:1999 - Preparação de Solução-mãe e Diluições NP 2079:1989 - Regras gerais para Análise Microbiológica NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas
	Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes	NP 2164:1983 - Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas

		NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas NP 2079:1989 - Regras gerais para Análise Microbiológica
	Regras gerais para a pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	NP 2308: 1986 - Regras gerais para a pesquisa de <i>Escherichia coli</i> NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas NP 2164:1983 - Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes NP 2079:1989 - Regras gerais para Análise Microbiológica
	Regras gerais para a contagem de <i>Escherichia coli</i> β-glucuronidase positiva Técnica de contagem de colónias a 44°C usando 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronide	ISO 16649-2:2001 - Regras gerais para a contagem de <i>Escherichia coli</i> β-glucuronidase positiva ISO 6887-1:1999 - Preparação de Solução-mãe e Diluições
	Regras gerais para a contagem de bactérias coliformes a 30°C	NP 3788:1990 - Regras gerais para a contagem de bactérias coliformes a 30°C NP 3005:1985 - Preparação das diluições para Análises Microbiológicas NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas
	Regras gerais para a contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> e outras espécies) Parte 1 - Técnica com confirmação de colónias (método corrente)	NP 4400-1:2002 - Regras gerais para a contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> e outras espécies) Parte 1 - Técnica com confirmação de colónias (método corrente) ISO 6887-1:1999 - Preparação de Solução-mãe e Diluições NP 2079:1989 - Regras gerais para Análise Microbiológica NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas
	Zaragatoas - Contagem de colónias a 30°C	ISO 18593:2004 - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs ISO 4833:2003 - Método horizontal para a contagem de microrganismos Contagem de colónias a 30°C
	Regras gerais para a determinação de <i>Enterobacteriaceae</i> sem revitalização. Técnica de contagem de colónias	NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas NP 2079:1989 - Regras gerais para Análise Microbiológica ISO 6887-1:1999 - Preparação de Solução-mãe e Diluições NP 4137:1991 - Regras gerais para a determinação de <i>Enterobacteriaceae</i> sem revitalização.
	Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores	NP 1828:1982 - Colheita de Amostras para Análises Microbiológicas NP 1829:1982 - Preparação de Amostras para Análises Microbiológicas NP 2079:1989 - Regras gerais para Análise Microbiológica ISO 6887-1:1999 - Preparação de Solução-mãe e Diluições NP 2262:1986 - Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores
	Método horizontal para a detecção de <i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002 - Método horizontal para a detecção de <i>Salmonella</i> spp. NP 7218:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for the microbiological examinations ISO 6887:1999 - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
	Deteção e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> pelo método horizontal. Parte	ISO 6887:1983 - Microbiology - General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination ISO 7218:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations

	1: Método de detecção	ISO 11290-1 - Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data
	Deteção e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> pelo método horizontal. Parte 2: Método de contagem	ISO 6887:1983 - Microbiology - General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination  ISO 7218:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations ISO 11290-2 - Amendment 1: Modification of the enumeration media
	Método horizontal para a contagem de presumíveis <i>Bacillus cereus</i> - técnica de contagem de colónias a 30°C	ISO 7932:2004 ISO 6887-1:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations ISO/TS 11133-2:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media
	Contagem de microrganismos cultiváveis. Contagem por inoculação em nutriente agar.	ISO 6222:1999 - Water quality - Enumeration of culturable microorganisms- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium EN ISO 3696 - Water for analytical laboratory use - Specification and test methods (ISO 3696:1987) EN ISO 5667-3 - Water quality - Sampling - Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples (ISO 5667-3:1994) EN ISO 25667-2 - Water quality - Sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques (ISO 5667-2:1991) ISO 6887 - Microbiology - General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examinations ISO 8199 - Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture
	Deteção e contagem de <i>Escherichia coli</i> e bactérias coliformes. Parte 1: Método de filtração por membrana	ISO 9308-1:2000 - Water Quality - detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria Part 1: Membrane filtration method ISO/EC Guide 2 - Standardization and related activities - General vocabulary ISO 3696:1987 - Water for analytical laboratory use - Specification and test methods ISO 5667-1:1980 - Water quality - sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes ISO 5667-2:1991 - Water quality - sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques ISO 5667-3:1994 - Water quality - sampling - Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples ISO 6887-1 - Microbiology - General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examinations ISO 8199 - Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture
	Deteção e contagem de <i>Enterococcus</i> intestinais. Parte 2: Método de filtração por membrana	ISO 7899-2 - Water quality - detection and enumeration of intestinal <i>enterococci</i> . Membrane filtration method ISO 3696:1987 - Water for analytical laboratory use - Specifications and test methods ISO 5667-1:1980 - Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes ISO 5667-2:1991 - Water quality - Sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques ISO 5667-3:1994 - Water quality - Sampling - Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples ISO 6887-1:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions ISO 8199:1988 - Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture ISO/EC Guide 2:1996 - Standardization and related activities - General vocabulary
	Enumeração de <i>Clostridium perfringens</i> por	Norma W5 – HPA - Enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> by membrane filtration

	filtração em membrana	SOP:W1 Section 5 - General technique for the detection and enumeration of bacteria by negative pressure membrane filtration
	Amostragem de água para consumo humano	ISO 5667-1 - Water quality - Sampling - Guidance on the design of sampling programmes and sampling ISO 5667-3 - Water quality - Sampling - Guidance on the preservation and handling of water samples ISO 5667-5 - Water quality - Sampling - Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems ISO 5667-14 - Water quality - Sampling - Part 3: Guidance on quality assurance of environmental ISO 19458 - Water quality - Sampling for microbiological analysis ERSAR 3/2010 - Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento
	Zaragatoas - Contagem de Enterobacteriaceae sem revitalização	ISO 18593:2004 - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs ISO 21528-2: 2004 - Regras gerais para a determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização. Técnica de contagem de colónias
	Método horizontal para técnica de amostragem de superfícies usando zaragatoas	ISO 18593:2004 - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
	Cálculo de incertezas	OGC005 - Guia para a estimativa de incerteza em ensaios microbiológicos ISO/TS 19036 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
	Método horizontal para a contagem de microrganismos Contagem de colónias a 30°C	ISO 6887 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination ISO 7218 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations ISO/TS 11133-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media
	Método horizontal para a contagem de bactérias coliformes	ISO 6887 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination ISO 7218 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations ISO/TS 11133-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media
	Método horizontal para a contagem de Estafilococos coagulase positiva ( <i>Staphylococcus aureus</i> e outras espécies) Parte 1 - Técnica usando Baird Parker agar medium	ISO 6887 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination ISO 7218 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations
	Regras gerais para a determinação de <i>Enterobacteriaceae</i> sem revitalização. Técnica de contagem de colónias	ISO 6887 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination ISO 7218 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations ISO/TS 11133-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media

## Anexo 2 - Método horizontal para contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30°C.

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	Ver a ISO 6887 para a Colheita e para a Preparação das amostras e as respetivas normas dos produtos a analisar. A execução da análise segue as regras gerais estabelecidas na ISO 7218.
<b>Preparação da suspensão mãe e séries de diluições</b>	Ver preparação suspensão mãe e diluições (ISO 6887-1:1999) e as normas referentes ao produto a analisar. O número de diluições deve ser suficiente para que as sementeiras das últimas diluições deem resultados negativos.
<b>Sementeira e Incubação</b>	Com uma pipeta esterilizada colocar, em placa de Petri estéril, 1 mL da amostra (produtos líquidos) ou da suspensão-mãe (outros produtos) e/ou de cada uma das diluições efetuadas. Adicionar cerca de 15 mL de meio PCA, previamente preparado de acordo com as prescrições do fabricante, arrefecido a 44-47°C, a cada placa e misturar cuidadosamente o inóculo ao meio de cultura. Deixar solidificar. Após solidificação completa do meio de cultura e unicamente no caso de suspeita de o produto a examinar conter microrganismos cujas colónias possam invadir a superfície do meio, cobrir esta superfície com aproximadamente 4 mL de ágar não nutritivo, previamente preparado de acordo com as prescrições do fabricante, a cerca 44-47°C. Deixar solidificar. Incubar as placas de Petri, assim preparadas e invertidas, na estufa à temperatura de 30 °C $\pm$ 1 °C durante 72 h $\pm$ 3 h. Não empilhar mais do que 6 placas que devem estar afastadas das paredes da estufa.
<b>Contagem de colónias</b>	Proceder à contagem de todas as colónias desenvolvidas após o período de incubação determinado. Não sendo possível fazê-la de imediato, as placas são conservadas à temperatura de 4 °C $\pm$ 1 °C durante um período máximo de 48 h. Contar as colónias em cada placa de Petri de duas diluições sucessivas que contenham entre 15 e 300 colónias.
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	Realizar os cálculos no MyLAb.

### Anexo 3 - Regras gerais para contagem de Bolores e Leveduras a 25 °C Parte 1: Método corrente.

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	Ver a NP 1828:1982 para a Colheita e a NP 1829:1982 para a Preparação das amostras e as respectivas normas dos produtos a analisar. Se a análise não puder ser analisada imediatamente, deve conservar-se entre 4 e 10 °C. O período de conservação deverá ser indicado no relatório de análise e não deverá exceder três dias. A execução da análise segue as regras gerais estabelecidas na NP 2079:1989.
<b>Preparação da suspensão mãe e séries de diluições</b>	Preparação da suspensão-mãe e das diluições é realizada de acordo com ISO 6887-1:1999.
<b>Sementeira e Incubação</b>	As diluições utilizadas na sementeira dependem do grau de contaminação previsto. Preparar duas placas de Petri esterilizadas. Com uma pipeta esterilizada, colocar em cada uma das placas, 1 mL da amostra (produtos líquidos) ou da suspensão-mãe (outros produtos). Repetir este procedimento para as restantes diluições efetuadas. Adicionar 15 mL do meio de cultura DRBC, previamente preparado, esterilizado e mantido a 45-50 °C. Misturar cuidadosamente com o inóculo e agitar suavemente as placas. Deixar solidificar. O tempo decorrido entre a preparação da suspensão-mãe, das diluições e a distribuição do meio de cultura não deve ultrapassar os 15 minutos. Após a sementeira, incubar as placas invertidas a 25 °C ± 1 °C durante 5 dias.
<b>Contagem de colónias</b>	Após o período de incubação de 5 dias, em que pode ser necessário fazer uma contagem antecipada ao 3º ou 4º dia, contar as colónias em cada placa que apresente menos de 150 colónias. Se houver dificuldade na contagem de colónias por invasão de bolores, utilizar as contagens obtidas ao 3º ou 4º dia de incubação. Neste caso, o número de dias de incubação deve ser referido no boletim de ensaios.
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	Realizar os cálculos no MyLAB.



#### Anexo 4 - Regras gerais para a pesquisa de bactérias coliformes.

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	Ver a NP 1828:1982 para a Colheita e a NP 1829:1982 para a Preparação das amostras e as respectivas normas dos produtos a analisar.
<b>Preparação da suspensão mãe e séries de diluições</b>	Para a preparação da suspensão-mãe e das diluições ver a NP 2079:1989 e as normas específicas do produto a analisar. As diluições devem ser suficientes para que os tubos semeados com as últimas diluições dêem resultados negativos.
<b>Sementeira e Incubação</b>	Semeia-se 10 mL da amostra (produtos líquidos) ou da suspensão mãe (outros produtos), num tubo (com um tubo de Durham) com meio seletivo BGGB de concentração dupla, preparado de acordo com as especificações do fabricante, e 1 mL da mesma suspensão e seguintes diluições num tubo (com um tubo de Durham) do mesmo meio de concentração simples. Mistura-se bem o inóculo e o meio de cultura, evitando a inclusão de bolhas de ar. Incubar os tubos semeados na estufa a $30 \pm 1$ °C durante 48 h.
<b>Leitura</b>	Após a incubação dos tubos dos meios seletivos dos dois enriquecimentos, consideram-se positivos os tubos em que se nota turvação e formação de gás no tubo Durham, devendo o gás no tubo atingir pelo menos 1/10 da altura do tubo.
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	O resultado apresentar-se-á, na forma decimal, do seguinte modo: <ul style="list-style-type: none"><li>• positivo em 10d1 g ou mL ;</li><li>• negativo em 10d2 g ou mL.</li></ul> Em que: <ul style="list-style-type: none"><li>• d1 é o expoente da mais alta diluição decimal positiva;</li><li>• d2 é o expoente da mais baixa diluição decimal negativa.</li></ul>

## Anexo 5 - Regras gerais para a pesquisa de *Escherichia coli*.

<b>Sementeira e Incubação</b>	<p>A execução da análise segue as regras gerais estabelecidas na NP 2079:1989.</p> <p>Separam-se os tubos de BGGB na pesquisa de bactérias coliformes (NP 2164:1983) que apresentam resultado positivo.</p> <p>De cada um desses tubos, transfere-se uma ansa com meio de cultura para cada um de 2 tubos, um com BGGB e outro com PW.</p> <p>Incuba-se os tubos semeados em banho de água a <math>44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}</math> durante 48 h.</p>
<b>Leitura</b>	<p>Após a incubação dos tubos dos meios seletivos consideram-se positivos:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• os tubos com BGGB que tenham gás no tubo Durham até pelo menos 1/10 de altura;</li><li>• os tubos com PW nos quais se deteta a produção de indol pela formação de um anel sobrenadante vermelho, após a adição de cerca de 1ml de reagente Kovacs, seguido de agitação e repouso.</li><li>• Considera-se a pesquisa de <i>Escherichia coli</i> positiva nas diluições que apresentam resultados positivos simultaneamente nos 2 testes atrás indicados.</li><li>• Considera-se a pesquisa de <i>Escherichia coli</i> negativa nas diluições que apresentam resultados negativos em um daqueles testes ou em ambos.</li></ul>
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	<p>O resultado apresentar-se-á, na forma decimal, do seguinte modo:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• positivo em 10d1 g ou mL</li></ul> <p>e</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• negativo em 10d2 g ou mL</li></ul> <p>Em que:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• d1 é o expoente da mais alta diluição decimal positiva;</li><li>• d2 é o expoente da mais baixa diluição decimal negativa.</li></ul>

**Anexo 6 - Regras gerais para a contagem de *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positiva. Técnica de contagem de colónias a 44°C usando 5-bromo-4-cloro-3-indol  $\beta$ -D-glucuronide.**

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	A amostra deve ser representativa e não deve sofrer alterações durante o transporte e armazenamento. Preparar a amostra de acordo com o produto a analisar.
<b>Preparação da suspensão mãe e séries de diluições</b>	Ver a EN ISO 6887-1 e as normas referentes aos produtos a analisar. O número de diluições deve ser suficiente para que as sementeiras das últimas diluições dêem resultados negativos.
<b>Sementeira e Incubação</b>	Com uma pipeta esterilizada colocar, em placa de Petri estéril, 1 mL da amostra, se o produto é líquido, ou da suspensão mãe de outros produtos e/ou de cada uma das diluições efetuadas. Adicionar cerca de 15 mL de meio de cultura (cromogénico), arrefecido a cerca de 44 - 47 °C, em cada placa e misturar cuidadosamente o inóculo e o meio de cultura. Deixar solidificar. O tempo passado entre a inoculação das placas e a distribuição do meio não deve exceder os 15 min. Incubar as placas invertidas em estufa a 44 °C $\pm$ 1 °C durante 18 a 24 h. O tempo total de incubação não deve exceder as 24 h. No caso de suspeitar de uma eventual presença de <i>Escherichia coli</i> em condições de "stress" no produto em análise, deve-se proceder a uma incubação prévia a 37 °C $\pm$ 1 °C durante 4 h.
<b>Contagem de Colónias</b>	Após o período de incubação, proceder a contagem de colónias características de <i>Escherichia coli</i> considerando apenas as placas que não contenham mais do que 150 colónias características e 300 colónias totais (características e não características). As colónias características são azuis/esverdeada .
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	Realizar os cálculos no MyLAB

## Anexo 7 - Zaragatoas - Contagem de colónias a 30°C.

<b>Preparação do material de recolha de zaragatoas</b>	Em condições de higiene e assepsia adicionar ao tubo com zaragatoa estéril, um determinado volume de diluente neutralizante esterilizado de acordo com a sua capacidade. Preparar moldes da área a avaliar e esteriliza-los por autoclavagem. A área estimada deve ser de 20cm <sup>2</sup> a 100cm <sup>2</sup> .
<b>Recolha da zaragatoa</b>	Utilizando um molde devidamente esterilizado proceder à análise da área avaliada removendo a zaragatoa e pressionando contra a parede do tubo para remover o excesso de diluente rodando a zaragatoa e movendo-a em várias direções.
<b>Transporte</b>	Transportar as zaragatoas em mala refrigerada. Analisar as zaragatoas o mais cedo possível e não depois de 24h.
<b>Sementeira e Incubação</b>	Agitar a zaragatoa utilizando o vortex. Se se esperar contaminações muito elevadas proceder às diluições necessárias. Colocar 1mL de inóculo e das diluições em placa de Petri. Verter cerca de 15mL de PCA, agitar convenientemente e deixar solidificar. Inverter e incubar as placas à temperatura de 30°C±1 durante 72h.
<b>Contagem de Colónias</b>	Proceder à contagem de todas as colónias desenvolvidas após o período de incubação determinado. Não sendo possível fazê-la de imediato, as placas são conservadas à temperatura de 4 °C ±1 °C durante um período máximo de 48 h. Contar as colónias em cada placa de Petri que contenham entre 15 e 300 colónias.
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	Calcular o número NS de microrganismos por cm <sup>2</sup> de superfície a analisar, com a ajuda da equação seguinte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>NS = (N \times F / A) \times D</math></li> </ul> Em que: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N nº de UFC em 1mL de diluente;</li> <li>• F quantidade, em mL, de diluente no tubo;</li> <li>• A área da superfície avaliada em cm<sup>2</sup>;</li> <li>• D diluição considerada.</li> </ul> Se a área avaliada não estiver definida, calcular NSW com a ajuda da equação seguinte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>NSW = N \times F \times D</math></li> </ul> Arredondar o valor obtido a dois algarismos significativos. Realizar os cálculos no MyLAB.

## Anexo 8 - Regras gerais para a pesquisa de esporos de Clostrídios sulfito-redutores.

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	Ver a NP 1828:1982 para a Colheita e a NP 1829:1982 para a Preparação das amostras e as respectivas normas dos produtos a analisar.
<b>Preparação da suspensão mãe e séries de diluições</b>	Para a preparação da suspensão-mãe e das diluições ver a NP 2079:1989 e as normas específicas do produto a analisar. O meio de cultura é reconstituído em concentração simples e em concentração dupla após o qual são distribuídos em tubos de ensaio adequados e por fim autoclavados. Se o meio não for autoclavado no próprio dia de utilização é necessário ferver o meio em banho-maria durante 15 min para eliminar o oxigénio absorvido. Depois são mantidos a cerca de 45 °C até ao momento de ser utilizado.
<b>Inativação das células vegetativas e estimulação dos esporos</b>	As formas vegetativas microbianas são inativadas colocando os tubos de ensaio que contêm o produto líquido ou a suspensão-mãe do produto sólido e as respetivas diluições (tubos com 10 mL) em banho de água a 80°C por 10 min. Depois de terminada a inativação é seguida de um arrefecimento imediato .
<b>Sementeira e Incubação</b>	No caso de alimentos líquidos a sementeira é realizada em duplicado 1 mL da amostra e diluições em MYA conc. simples. No caso de alimentos sólidos a sementeira é realizada em duplicado 10 mL da suspensão-mãe em meio de cultura de concentração dupla e 1ml da suspensão-mãe e diluições em meio de cultura de concentração simples. A sementeira efetua-se misturando o produto inativado com o meio de cultura, agitando muito levemente para evitar bolhas de ar e arrefece-se imediatamente em água fria. Incubar os tubos semeados na estufa a $37 \pm 1$ °C durante 1 a 5 dias.
<b>Leitura</b>	Após incubação consideram-se positivos os tubos que apresentam colónias negras características isoladas ou não, uma vez que as colónias resultantes do desenvolvimento dos esporos das bactérias sulfito-redutoras tem tendência para alastrar e enegrecer todo o meio. Considera-se a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores positiva nas diluições que apresentarem resultados positivos; Considera-se a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores negativa nas diluições que apresentarem resultados negativos.
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	O resultado apresentar-se-á, na forma decimal, do seguinte modo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• positivo em <math>10^{d1}</math> g ou mL ;</li> <li>• negativo em <math>10^{d2}</math> g ou mL.</li> </ul> Em que: <ul style="list-style-type: none"> <li>• d1 é o expoente da mais alta diluição decimal positiva;</li> <li>• d2 é o expoente da mais baixa diluição decimal negativa.</li> </ul>

## Anexo 9 - Método horizontal para a deteção de *Salmonella* spp.

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	Ver a ISO 7218:1996 para regras gerais de análises microbiológicas na colheita e preparação da amostra.
<b>Pré-enriquecimento - meio líquido não seletivo</b>	Inocular 25 g amostra em 225 mL de BPW à temperatura ambiente e incubar durante $18 \pm 2$ h a $37 \pm 1$ °C. Para grandes quantidades o BPW deve ser aquecido a $37 \pm 1$ °C antes da inoculação. Introduzir uma espécie de referência desde o pré-enriquecimento realizando um controlo positivo. Proceder da mesma forma que as amostras testadas.
<b>Enriquecimento em meio seletivo</b>	Após o pré-enriquecimento inocular 0,1 mL de cultura a 10 mL de RVS broth durante $24 \pm 3$ h a $41,5 \pm 1$ °C. Ao mesmo tempo inocular 1 mL de cultura em 10 mL de MKTTn broth $24 \pm 3$ h a $37 \pm 1$ °C.
<b>Sementeira e Incubação</b>	Sementeira de cada uns dos meios de enriquecimento por estria em: ●XLD (incubar as placas invertidas durante $24 \pm 3$ h a $37 \pm 1$ °C) ●SS (incubar as placas invertidas durante $24 \pm 3$ h a $37 \pm 1$ °C)
<b>Leitura</b>	Após incubação examinar as placas para a presença de colónias típicas ou atípicas de <i>Salmonella</i> . Colónias típicas de <i>Salmonella</i> em XLD têm centro preto e uma zona ligeiramente transparente rosado devido à mudança de cor do indicador. Nota: Em XLD espécies de <i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S negativo (ex.: <i>S. Paratyphi</i> A) apresentam coloração rosa com centro rosa escuro; espécies lactose positiva são amarelas com centro preto. Em SS as colónias típicas são transparentes com ou sem centro preto.
<b>Confirmação</b>	Para confirmação retirar pelo menos uma colónia considerada típica ou suspeita e mais quatro colónias de cada placa. Se numa placa existir menos do que 5 colónias típicas ou suspeitas confirmar todas. Inocular as colónias por estrias em meio NA de forma a permitir o crescimento de colónias isoladas. Incubar durante $24 \pm 3$ h a $37 \pm 1$ °C. Usar apenas culturas puras para os testes bioquímicos e serológicos. Testes bioquímicos: TSI agar - Inocular a rampa e incubar a $37 \pm 1$ °C $24 \pm 3$ h  Profundidade: amarelo - glucose positiva vermelho ou sem alteração - glucose negativa preto - formação de sulfito de hidrogénio bolhas ou rachas - formação de gás

	<p>Superfície:</p> <p>amarelo - lactose e sucrose positivo</p> <p>vermelho ou sem alteração - lactose e sucrose positivo</p> <p>Culturas típicas de <i>Salmonella</i> apresentam coloração vermelha na rampa e amarela em profundidade com formação de gás e (90% das vezes) formação de sulfeto de hidrogénio. Quando a <i>Salmonella</i> isolada é lactose positiva a rampa fica amarela.</p> <p>Quando a rampa é típica de <i>Salmonella</i>, fazer o API 20 E de acordo com as instruções do fabricante.</p> <p>Quando o API for positivo enviar colónias puras para avaliação serológica e identificação em instituto de referência.</p>
--	---

## Anexo 10 - Detecção e contagem de *Listeria monocytogenes* pelo método horizontal. Parte 1: Método de detecção.

<b>Colheita e Preparação da Amostra</b>	Acolheita da amostra deve ser efetuada cuidadosamente e deve ser representativa. A preparação da amostra deve ser realizada adequadamente.
<b>Preparação da solução-mãe</b>	Ver ISO 6887. Para a preparação da suspensão inicial, usar como diluente o meio de enriquecimento half Fraser broth. Usar o fator de diluição 1/10.
<b>Primeiro enriquecimento</b>	Incubar a solução-mãe a 30 °C durante 24 ± 2 h. Nota: Durante a incubação pode desenvolver-se coloração preta.
<b>Segundo enriquecimento</b>	Retirar 0,1 mL da solução obtida no passo anterior após incubação e colocar num tubo contendo 10 mL de meio de enriquecimento Fraser broth. Incubar o tubo a 37 °C durante 48 ± 2 h. Nota: A temperatura de incubação deve ser escolhida no laboratório e deve ser especificada no boletim de ensaio.
<b>Planeamento e Identificação</b>	Com uma ansa da solução do primeiro enriquecimento e inocular a superfície de meio ALOA. Proceder da mesma forma com o segundo meio seletivo, meio Oxford. Realizar o mesmo procedimento descrito antes para o segundo meio de enriquecimento. Inverter todas as placas obtidas e colocar em estufa a 37 °C. Após incubação durante 24 h e se necessário incubar mais 18-24 h (se o crescimento não se verificar), examinar as placas e verificar a presença de presumíveis colónias de <i>Listeria</i> spp. No meio ALOA, as colónias típicas de <i>Listeria monocytogenes</i> são azul-esverdeadas, rodeadas por um galo opaco. Se não se verificar crescimento após as 24 h de incubação, voltar a incubar por mais 24 ± 3 h. No meio Oxford as colónias típicas de <i>Listeria</i> spp. são pequenas, cinzentas e rodeadas por um halo negro. Após 48 h as colónias tornam-se mais escuras, com um possível brilho esverdeado e têm cerca de 2 mm de diâmetro, com halos negros e fundos escavados.
<b>Confirmação de <i>Listeria</i> spp.</b>	Seleção das colónias: - Tirar de cada placa de cada meio seletivo, 5 presumíveis colónias de <i>Listeria</i> spp. (se a placa tiver menos de 5, retirar todas); - Realizar um riscado das colónias em placas com meio TSYEA, de forma a ficarem bem separadas. Colocar na estufa a 37 °C durante 18-24 h ou até crescimento satisfatório; - As colónias típicas têm 1-2 mm de diâmetro, são convexas, sem cor e opacas com borda inteira. Se as colónias não estão bem separadas, retirar uma colónia típica de <i>Listeria</i> spp. e colocar noutra placa de TSYEA. Efetuar os testes seguintes em colónias puras no meio TSYEA:



	<p>Reação da catalase: Isolar uma das colónias puras obtidas e suspender em solução de peróxido de hidrogénio. A formação imediata de bolhas de gás, indicam uma reação positiva.</p> <p>Coloração de Gram : Efetuar o teste de coloração de Gram numa colónia isolada. <i>Listeria</i> spp. é uma bactéria gram-positiva fina, com hastes curtas.</p> <p>Teste de motilidade (se necessário): Retirar uma colónia isolada e suspender em tubo com meio TSYEB. Incubar a 25 °C durante 8-24 h até se observar a formação de turvação no meio. Retirar uma gota desta solução e colocar numa lâmina. Cobrir com lamela e examinar ao microscópio. <i>Listeria</i> spp. são bacilus curtos e longos e com motilidade em cambalhota. Culturas que cresceram a menos de 25 °C podem não exibir esta motilidade.</p>
<b>Confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<p>Se os testes indicarem a presença de <i>Listeria</i> spp. proceder à realização dos seguintes testes, utilizando uma colónia isolada em TSYEA:</p> <p>Teste de hemólise Com um fio de ansa colocar uma colónia em Agar de Sangue de Ovelha. Simultaneamente inocular um controlo positivo (<i>L.monocytogenes</i>) e um controlo negativo (<i>L.innocua</i>). Após incubação a 37 °C durante 24 ± 2 h.</p> <p>Examinar as placas resultantes à luz: <i>L.monocytogenes</i> - apresenta reação fraca mas com zonas mais claras de hemólise; <i>L.innocua</i> - não apresenta zonas mais claras; <i>L.seeligeri</i> - apresenta uma zona de fraca hemólise; <i>L.ivanovvi</i> - normalmente apresenta reação forte e as zonas de hemólise são bem definidas.</p> <p>API Proceder ao API <i>Listeria</i> de acordo com as instruções do fabricante. Se positivo, avançar para o teste seguinte.</p> <p>Teste de CAMP: Proceder ao Teste de CAMP de acordo com a IT.</p>
Interpretação dos testes de confirmação e expressão de resultados	Interpretar os resultados dos testes de confirmação de acordo com a seguinte tabela. Passagem dos resultados obtidos para o MyLAB.

Espécies	Hemólise	Produção de ácido		CAMP test	
		Rhamnose	Xilose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

Em que:

V reação variável

(+) reação fraca

+ >90% reação positiva

- reação negativa

Nota: Raras estirpes de *L. monocytogenes* não apresentam β-hemólise nem fazem reação positiva no teste de CAMP.

## Anexo 11 - Detecção e contagem de *Listeria monocytogenes* pelo método horizontal. Parte 2: Método de contagem.

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	Acolheita da amostra deve ser efetuada cuidadosamente e deve ser representativa. A preparação da amostra deve ser realizada adequadamente.
<b>Preparação da solução-mãe</b>	Ver ISO 6887. Para a preparação da suspensão inicial, usar como diluente o meio de enriquecimento half Fraser broth ou Buffered Peptone Water. Usar o fator de diluição 1/10. Incubar a solução-mãe a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $1\text{ h} \pm 5\text{ min}$ .
<b>Inoculação e Incubação</b>	Transferir 0,1 mL da suspensão obtida no passo anterior para cada uma de duas placas de ALOA. Repetir este procedimento para as seguintes diluições. Incubar as placas invertidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{ h}$ . Mais $24 \pm 3\text{ h}$ se o crescimento for insuficiente ou se não existirem qualquer crescimento.
<b>Contagem de colónias características</b>	No meio ALOA as colónias típicas de <i>Listeria</i> spp. são pequenas, verdes azuladas e rodeadas por um halo opaco. Algumas estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> apresentam halo muito fraco. Contar as colónias presumíveis de <i>Listeria</i> spp. em cada placa que contenha menos de 150 colónias características ou não características.
<b>Confirmação de <i>Listeria</i> spp.</b>	Seleção das colónias: Depois da incubação manter as todas as placas que tenham menos do que 150 colónias, se possível, de duas diluições sucessivas. - Tirar de cada placa de cada meio seletivo, 5 presumíveis colónias de <i>Listeria</i> spp. (se a placa tiver menos de 5, retirar todas); - Realizar um riscado das colónias em placas com meio TSYEA, de forma a ficarem bem separadas. Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h ou até crescimento satisfatório; - As colónias típicas têm 1-2 mm de diâmetro, são convexas, sem cor e opacas com borda inteira. Se as colónias não estão bem separadas, retirar uma colónia típica de <i>Listeria</i> spp. e colocar noutra placa de TSYEA. Efectuar os testes seguintes em colónias puras no meio TSYEA: Reacção da catalase Isolar uma das colónias puras obtidas e suspender em solução de peróxido de hidrogénio. A formação imediata de bolhas de gás, indicam uma reacção positiva. Coloração de Gram Efectuar o teste de coloração de Gram numa colónia isolada. <i>Listeria</i> spp. é uma bactéria gram-positiva fina, com hastes curtas. Teste de motilidade (se necessário) Retirar uma colónia isolada e suspender em tubo com meio TSYEB. Incubar a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8-24 h até se observar a formação de turvação no meio. Retirar uma gota desta solução e colocar numa lâmina. Cobrir com lamela e examinar ao microscópio. <i>Listeria</i> spp. são bacilos curtos e longos e com motilidade em cambalhota. Culturas que cresceram a menos de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ podem não exibir

	<p>esta motilidade.</p> <p>Se os testes indicarem a presença de <i>Listeria</i> spp. proceder à realização dos seguintes testes, utilizando uma colónia isolada em TSYEA:</p> <p>Teste de hemólise</p> <p>Com um fio de ansa colocar uma colónia em Agar de Sangue de Ovelha. Simultaneamente inocular um controlo positivo (<i>L.monocytogenes</i>) e um controlo negativo (<i>L.innocua</i>). Após incubação a 35-37 °C durante 24 ± 2 h.</p> <p>Examinar as placas resultantes à luz:</p> <p><i>L.monocytogenes</i> - apresenta reação fraca mas com zonas mais claras de hemólise;</p> <p><i>L.innocua</i> - não apresenta zonas mais claras;</p> <p><i>L.seeligeri</i> - apresenta uma zona de fraca hemólise;</p> <p><i>L.ivanovvi</i> - normalmente apresenta reação forte e as zonas de hemólise são bem definidas.</p> <p>API:</p> <p>Proceder ao API Listeria de acordo com as instruções do fabricante. Se positivo avançar para o teste seguinte.</p> <p>Teste de CAMP:</p> <p>Proceder ao Teste de CAMP de acordo com a IT.</p>																																																				
<p><b>Interpretação dos testes de confirmação e expressão de resultados</b></p>	<p>Interpretar os resultados dos testes de confirmação de acordo com a seguinte tabela. Passagem dos resultados obtidos para o MyLAB.</p> <table><tr><th rowspan="2">Espécies</th><th rowspan="2">Hemólise</th><th colspan="2">Produção de ácido</th><th colspan="2">CAMP test</th></tr><tr><th>Rhamnose</th><th>Xilose</th><th><i>S. aureus</i></th><th><i>R. equi</i></th></tr><tr><td><i>L. monocytogenes</i></td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td></tr><tr><td><i>L. innocua</i></td><td>-</td><td>V</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td><i>L. ivanovii</i></td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td></tr><tr><td><i>L. seeligeri</i></td><td>(+)</td><td>-</td><td>+</td><td>(+)</td><td>-</td></tr><tr><td><i>L. welshimeri</i></td><td>-</td><td>V</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td><i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i></td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td><i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i></td><td>-</td><td>V</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table> <p>Em que:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• V reação variável</li><li>• (+) reação fraca</li><li>• + &gt;90% reação positiva</li><li>• - reação negativa</li><li>• Nota: Raras estirpes de <i>L. monocytogenes</i> não apresentam β-hemólise nem fazem reação positiva no teste de CAMP.</li></ul>	Espécies	Hemólise	Produção de ácido		CAMP test		Rhamnose	Xilose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-	<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+	<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-	<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-	<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-
Espécies	Hemólise			Produção de ácido		CAMP test																																															
		Rhamnose	Xilose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>																																																
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-																																																
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-																																																
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+																																																
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-																																																
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-																																																
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-																																																
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-																																																

**Anexo 12 – Método horizontal para a contagem de presumíveis *Bacillus cereus* - técnica de contagem de colónias a 30°C.**

<b>Colheita e Preparação da amostra</b>	É importante que a amostra recolhida seja representativa e que as suas características se mantenham durante o armazenamento e transporte. Preparar a amostra de teste de acordo com a norma internacional específica para o produto em causa.
<b>Preparação da suspensão mãe</b>	Ver ISO 6887-1 e a norma internacional específica para o produto em causa.
<b>Inoculação e Incubação</b>	<p>- Transferir, com pipeta estéril, 0,1 mL da amostra (se for líquida) ou da suspensão inicial, para cada uma de duas placas de agar. Repetir o procedimento usando as diluições decimais necessárias.</p> <p>- Quando se deseja estimar um número reduzido de <i>Bacillus cereus</i>, os limites de deteção podem ser aumentados a um fator de 10, por exame de 1 mL de amostra ou suspensão inicial. Distribuir este volume na superfície de 3 placas de Petri e em duplicado.</p> <p>- Cuidadosamente, espalhar o inóculo ao longo da superfície do agár sem tocar nos lados da placa de Petri. Usar um espalhador estéril para cada placa. Deixar as placas com a tampa, durante 15 min, à temperatura ambiente para que o inóculo seja absorvido.</p> <p>Incubar de 18 a 24h a 30°C. Se após este período as colónias não forem claramente visíveis incubar por mais 24h.</p>
<b>Contagem de colónias</b>	<p>Selecionar as placas, preferencialmente de duas diluições sucessivas, com menos de 150 colónias.</p> <p>Contar as presumíveis colónias de <i>B.cereus</i> em cada placa. As colónias características são grandes, cor-de-rosa (indicando que a fermentação de manitol não ocorreu) e geralmente rodeadas por uma zona de precipitação (indicando a produção de lecitinase).</p> <p>Se houver menos de 15 colónias nas placas, é possível fazer uma contagem estimada segundo a fórmula de cálculo abaixo especificada.</p>
<b>Confirmação</b>	<p>Seleção e purificação de colónias para confirmação</p> <p>Selecionar 5 colónias características de cada placa escolhida acima. Se existir menos de 5 colónias, repicar todas as presentes. Confirmar estas colónias realizando os testes de hemólise com agar de sangue de ovelha e a testes bioquímicos.</p> <p>Se as placas estão superlotadas e não for possível selecionar colónias isoladas, realizar um riscado de 5 presumíveis colónias em placas com meio de agar MYP. Incubar a 30°C durante 18-24h.</p> <p>Selecionar de cada placas, pelo menos uma colónia cor-de-rosa bem isolada. Confirmar esta colónia pelos testes especificados abaixo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste de hemólise em agar de sangue de ovelha</li> </ul> <p>Riscar as colónias selecionadas na superfície do agar de sangue de ovelha de forma a permitir uma boa interpretação da</p>

	<p>reação de hemólise.</p> <p>Incubar a 30°C durante 24 ± 2h e interpretar a reação de hemólise. Uma reação positiva, confirma a presença de presumíveis <i>Bacillus cereus</i>.</p> <p>Interpretação bioquímica</p> <p>Em agar MYP, a formação de colónias cor-de-rosa, rodeadas por um precipitado, confirmam as presumíveis <i>Bacillus cereus</i>.</p>
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	Realizar os cálculos no MyLAB

### Anexo 13 - Contagem de microrganismos cultiváveis. Contagem por inoculação em nutriente agar.

<b>Preparação da Amostra</b>	Recolher as amostras de água de acordo com as instruções de amostragem, manuseamento e armazenamento contidas na EN 25667-2 e EN 5667-3. Examinar a água fornecida em contentores fechados, incluindo águas minerais naturais, no máximo após 12 h da colheita, mantendo a temperatura de armazenamento a $5 \pm 3$ °C durante este período.
<b>Preparação e inoculação</b>	Preparar a amostra, diluir e inocular no meio de cultura, de acordo com a ISO 8199, EN ISO 5667-3 e ISO 6887. Usar o método de incorporação (ISO 8199); colocar 1 mL de amostra numa placa de Petri, adicionar 15-20 mL do meio de agar fundido e misturar suavemente por rotação; Deixar o meio solidificar. O tempo entre a colocação da amostra e a adição do meio não deve exceder os 15 min. Inocular pelo menos uma placa para incubação a cada temperatura.
<b>Incubação e exame</b>	Inverter as placas e incubar um conjunto a $36 \pm 2$ °C durante $44 \pm 4$ h; Incubar o outro conjunto de placas a $22 \pm 2$ °C durante $68 \pm 4$ h. Examinar de imediato mal se retirem das estufas; Se tal não for possível, armazenar as placas a $5 \pm 3$ °C e examinar dentro de 48 h. Rejeitar as placas com crescimento confluyente.
<b>Contagem de colónias</b>	Para cada temperatura de incubação, e seguindo a metodologia descrita na ISO 8199, contar as colónias presentes em cada placa e calcular o número estimado de unidades formadoras de colónias (UFC) presentes em 1 mL de amostra.
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	Exprimir os resultados em unidades formadoras de colónias por 1 mL de amostra (UFC/mL) para cada temperatura de incubação. Se não houver colónias nas placas, expressar o resultado como "Não detetado em 1mL". Se forem contabilizadas mais de 300 colónias nas placas com a maior diluição usada, expressar os resultados como >300. Introduzir os resultados no Mylab.

# **Anexo 14 – Detecção e contagem de *Escherichia coli* e bactérias coliformes. Parte 1: Método de filtração por membrana.**

<b>Preparação da Amostra</b>	Retirar as amostras e entregar ao laboratório de acordo com as normas ISO 5667-1, ISO 5667-2 e ISO 5667-3. Para a preparação, filtração e inoculação no meio de isolamento, seguir as instruções fornecidas na ISO 8199 e ISO 6887-1. Iniciar o exame , preferencialmente, imediatamente após obtenção das amostras. Se as amostras são mantidas à temperatura ambiente (>25 °C), o exame deve ser realizado até 6 h após a recolha. Em circunstâncias especiais, as amostras podem ser mantidas a $5 \pm 3$ °C até 24 h antes do exame.
<b>Filtração</b>	Filtrar 100 mL (ou volumes superiores, ex: 250 mL de água engarrafada) da amostra a ser estudada, usando um filtro de membrana.
<b>Incubação e diferenciação</b>	<p>Após filtração, colocar o filtro no meio de agár lactose TTC e incubar a <math>36 \pm 2</math> °C durante <math>21 \pm 3</math> h assegurando que não há bolhas de ar presas por baixo.</p> <p>Nota 1: A extensão da incubação por <math>44 \pm 4</math> h pode resultar numa maior sensibilidade do teste e pode ser especialmente útil para placas que não mostram colónias típicas após as <math>21 \pm 3</math> h.</p> <p>Nota 2: O uso de uma membrana adicional para incubação a 44 °C pode superar o problema do crescimento em segundo plano. Examinar a membrana e contar as colónias características de bactérias lactose-positivas, que possuem cor amarela e encontram-se por baixo da membrana. Para os testes de oxidase e indole, repicar todas ou pelo menos 10 colónias características obtidas, no meio TSA e no caldo de triptofano, respectivamente.</p> <p>Incubar a placa com TSA a <math>36 \pm 2</math> °C durante <math>21 \pm 2</math> h, e realizar o teste oxidase do seguinte modo: - Colocar 2-3 gotas de reagente oxidase recém-preparado num papel de filtro; fazer um esfregaço de parte da colónia no papel de filtro; Se a reacção for positiva observa-se o aparecimento de uma cor intensa azul-violeta em 30 s.</p> <p>• Incubar o tubo de caldo de triptofano a <math>44 \pm 0,5</math> °C durante <math>21 \pm 3</math> h e examinar a produção de indol pela adição de 0,2-0,3 mL de reagente Kovac's. O desenvolvimento de uma cor vermelho-cereja na superfície confirma a produção do indole.</p> <p>- Contar todas as colónias que deram a reacção de oxidase negativa como Bactérias coliformes; - Contar todas as colónias que deram reacção de oxidase negativa e a recção ao indole positiva como E.coli.</p> <p>Nota 3: Em casos especiais, pode ser necessária a identificação de bactérias coliformes. Ex: para se distinguir entre espécies fecais e aquáticas.</p>
<b>Cálculo e expressão de resultados</b>	<p>A partir do número de colónias características contabilizadas na membrana e tendo em conta os resultados dos testes de confirmação realizados, calcular o nº de <i>E.coli</i>, bactérias coliformes.</p> <p>Passar as contagens obtidas para o MyLAB.</p>